Les mécanismes de réponse à l'inflammation chronique dans le foie stéatosique et les conséquences sur l'homéostasie cellulaire et la cancérogénèse

Davide Degli Esposti

▶ **To cite this version:**

Davide Degli Esposti. Les mécanismes de réponse à l'inflammation chronique dans le foie stéatosique et les conséquences sur l'homéostasie cellulaire et la cancérogénèse. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. ⟨NNT : 2011PA114809⟩. ⟨tel-00652594⟩

HAL Id: tel-00652594

https://theses.hal.science/tel-00652594v1

Submitted on 15 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ANNÉE 2010 - 2011 SÉRIE DOCTORAT N° 1105

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 15/06/2011

par

Davide DEGLI ESPOSTI

Les mécanismes de réponse à l'inflammation chronique dans le foie stéatosique et les conséquences sur l'homéostasie cellulaire et la cancérogenèse

Directeur de thèse :	Christian POÜS	Professeur/Praticien Hospitalier (Université Paris-Sud 11)
Co-directeur de thèse:	Antoinette LEMOINE	Professeur/ Praticien Hospitalier (Université Paris-Sud 11)

Composition du jury :

Président du jury :	Catherine GUETTIER	Professeur/Praticien Hospitalier (Université Paris-Sud 11)
Rapporteurs :	Filomena CONTI	Maître de Conférence/ Praticien Hospitalier (Université Paris 6)
	Valerie PARADIS	Professeur/ Praticien Hospitalier (Université Paris 7)
Examinateurs :	Carmen PERALTA	Directeur de Recherche (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Espagne)

RESUME

Le foie est un organe essentiel à la vie chez tous les mammifères. C'est un organe central du métabolisme énergétique et de la détoxification des substances xénobiotiques auxquelles l'individu est exposé. Le foie est la cible d'agressions diverses, telles que les virus, l'alcool, les substances chimiques présentes dans l'alimentation ou l'environnement. Il peut également subir des transformations pathologiques profondes, lors du diabète ou de l'obésité par exemple.

La stéatose hépatique, caractérisée par une accumulation de triglycérides sous forme de vésicules générant une réponse inflammatoire, est connue depuis de nombreuses années. Son étude a permis de définir un modèle en deux étapes (« t*wo hits* ») indispensables à la genèse d'une stéatohépatite ou NASH. La première est l'accumulation de lipides, la seconde consiste en la genèse d'un stress oxydant et la libération de cytokines. La NASH est une des conséquences pathologiques du syndrome métabolique au cours duquel une résistance des tissus à l'insuline se développe. Récemment, la composition des lipides accumulés dans la NASH a été décrite et montre la présence de cholestérol libre et de différents métabolites des acides gras dont la toxicité est grande mais variable. De façon surprenante, une nouvelle hypothèse tend à émerger quant aux rôles protecteurs de certaines catégories de lipides. En effet, le stockage des triglycérides sous forme de vésicules pourrait être un mécanisme de survie cellulaire (Neuschwander-Tetri, 2010). Il s'agirait principalement d'une tolérance à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Dans ce contexte, l'activation de l'autophagie serait capitale et la nécrose ne serait plus un mécanisme non contrôlé, mais au contraire un système finement régulé.

Des données expérimentales récentes suggèrent l'existence d'un réseau complexe d'interactions moléculaires qui lient, dans la NASH comme dans le cas de la cancérogenèse, le métabolisme énergétique, la réponse inflammatoire systémique et tissulaire et des altérations subcellulaires, telles que les lésions des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

Nous avons utilisé le cas particulier du préconditionnement ischémique, une technique chirurgicale qui consiste, grâce à de courtes périodes d'occlusion vasculaire avant l'ischémie, à conférer au tissu une protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R), pour étudier les mécanismes de survie mis en place par les hépatocytes stéatosiques au cours d'un stress d'I/R. Dans deux contextes différents, celui d'une ischémie chaude au cours d'une hépatectomie partielle et celui d'une ischémie froide au cours de la transplantation hépatique, nous avons montré que l'autophagie peut jouer un rôle central dans la protection des hépatocytes stéatosiques. Cependant, il est envisageable qu'un dysfonctionnement de l'autophagie pourrait conduire à la genèse d'altérations cellulaires comme une instabilité génomique, caractéristique de la transformation

cancéreuse. L'équilibre entre la survie et la mort cellulaire dépend donc de l'intégration de cette signalisation complexe, qui concerne l'état énergétique de la cellule, la réponse aux stress transitoires et l'adaptation aux stress chroniques. Dans ce contexte, l'autophagie semble jouer un rôle central dans l'intégration de la réponse aux stress (Kroemer et al 2010), ce qui pourrait favoriser directement ou indirectement la transformation cancéreuse d'une cellule.

L'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance et la survie des hépatocytes chargés de lipides en réponse à un stress inflammatoire, ischémique ou du réticulum endoplasmique semble donc essentielle. Elle permettrait en effet la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient améliorer la prise en charge des patients, augmenter le nombre de greffons disponibles pour les greffes, et la prévention des risques cancérogènes pour le foie.

SUMMARY

Liver is a an essential to life organ in all mammals. It plays a central role in energy and drug metabolism. Liver is constantly challenged by damaging compounds such as viruses, alcohol and chemicals from food intake or from the environment. It can also undergo some deep pathological transformations, e.g. in diabetes or obesity.

Liver steatosis has been known for many years, it is defined as an accumulation of triglycerides vesicles generating an inflammatory response in hepatocytes. A « two step hypothesis » has been proposed for the genesis of *Non Alcoholic Steatohepatitis* (NASH). The first step is the fat accumulation, the second step involves the generation of an oxidative stress and the release of cytokines. NASH is one of the pathological consequences of metabolic syndrome, when insulin resistance occurs in the tissues.

The composition of accumulated fat in NASH has been recently described and reveals the presence of free cholesterol and different fatty acids metabolites with a high but variable toxicity. Surprisingly, a new hypothesis tends to emerge about the protective effects of some types of lipides. Triglyceride storage in vesicles could indeed be a survival mechanism for cells (Neuschwander-Tetri, 2010). It is assumed that it would mainly result in an tolerance to cell death by necrosis or apoptosis. In this context, (activation of) autophagy would play a key-role and necrosis, usually an uncontrolled mechanism, would become accurately regulated.

Similarly to oncogenesis, recent experimental data in NASH suggest that energy metabolism, systemic and tissular inflammatory response and subcellular alterations such as impaired mitochondria and ER are connected in a complex network of molecular interactions.

Ischemic preconditioning (IP) is a surgical technique consisting of brief periods of vascular occlusion which confer protection against subsequent ischemia/reperfusion via endogenous protective mechanisms. We investigated the survival mechanisms set up by steatotic hepatocytes during I/R, with or without IP. In the following two situations, warm ischemia during partial hepatectomy and cold ischemia during liver transplantation, we pointed out that autophagy can play a central role in steatotic hepatocytes protection. However, an autophagy dysfunction might result in the generation of cellular impairments such as genomic instabilities, typical features of oncogenic transformation. Therefore, the balance between cell survival or death depends on the integration of a complex signaling, taking into account the cellular energetic state, the cell response to transient stress and its adaptation to chronical stress. In that context, autophagy seems to play a central role in the integration of stress response (Kroemer et al Mol Cell 2010), which could promote, directly or indirectly the malignant cell transformation.

Therefore, it seems essential to improve the understanding of mechanisms involved in tolerance and survival of lipid-full hepatocytes in response to an inflammatory, ischemic or ER stress. Indeed, this would help developing new therapeutical strategies to improve patients care, increase the number of available grafts for transplants, and prevent cancer risks in liver.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

Aux membres du jury

A Madame le Professeur Catherine Guettier pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

A Madame le Professeur Valerie Paradis et à Madame le Docteur Filomena Conti pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

A Madame le Docteur Carmen Peralta pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je voudrais tout particulièrement remercier le Professeur Antoinette Lemoine et le Professeur Christian Poüs pour m'avoir accueilli au sein des leurs laboratoires. Le soutien et la confiance qu'ils m'ont accordés m'ont permis de travailler en toute sérénité jusqu'au bout de cette thèse.

Ce travail a été financé par l'association « NRB - Vaincre le Cancer »; par le Groupement Coopératif de Transplantation d'Ile de France (GCIF) ; et par un financement du PRES Universud-Paris. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ces différents organismes pour m'avoir permis d'accomplir et de terminer ce travail et pour l'aide financière qu'ils apportent aux étudiants.

A tous ceux qui ont partagé ces années avec moi

Au Professeur Brigitte Debuire et au Docteur Claude Boucheix pour m'avoir accueilli si chaleuresement au sein respectivement du Service de Biochimie et Biologie Moléculaire et de l'Unité INSERM U602 lors de mon arrivée en France.

Au Professeur Brigitte Franc, pour m'avoir accueilli dans son service au début de ma thèse et avoir contribué avec sa vivacité intellectuelle à mon intégration en France.

Au Professuer Daniel Azoulay, pour m'avoir fait participer aux travaux de son équipe, et à tous les infermiers et médecins du bloc operatoire du Centre Hépatobiliaire pour leur accueil.

Au Docteur Mylène Sebagh, pour sa participation à certaines parties de ce travail, pour les discussions scientifiques et les bons moments passés ensemble.

A Francis Harper et au Docteur Gérard Pierron pour leur contribution precieuse en microscopie électronique.

Aux membres de l'unité INSERM 785, en particulier à Serena et Alexandre, pour leur aide et leur amitié.

A tous les membres de l'unité INSERM 1004 pour leur soutien et leur aide, en particulier Naouel, Jean François, Stéphanie et Eric Rubistein.

A Alban, Antonin, Benjamin, Donald et Laurie pour avoir stimulé et mis à l'épreuve mes capacités didactiques et pour avoir participé à l'activité de recherche.
A Catherine Brenner, Jocelyne Hamelin et Raphaël Saffroy qui m'ont guidé dans la mise au point des technique de biologie moléculaire et biochimie cellulaire.
A toutes les équipes des services de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'hôpital Paul Brousse et d'Anatomie pathologique des hôpitaux Paul Brousse et Ambroise Paré pour leur aide.
Un merci à Antonin et Alexandra qui ont corrigé des parties de cette thèse.

A mes amis

…éparpillés sur le globe. En particulier Tina, Piergiorgio, Christian, Laia, Luca, José Louis, Dario, Chiara, Cate, Martin, Laura, Alessandro, Graziella, Jessica, Katheryn, Bruno, Gaia, Sabrina, Pierluigi, Alessandro et Sabrina. Merci pour leur amitié, qui va au delà la distance et me va droit au cœur.

A ma famille

A mes parents qui ont toujours accepté et soutenu mes choix, même quand ils n'étaient pas d'accord.
A mon frère, à ma sœur et à mes neveux, Andrea et Lorenzo.

A mon épouse

Enfin un immense remerciement à Giuse avec laquelle j'ai partagé les moments les plus difficiles et les plus heureux de cette aventure et sans laquelle je ne serais pas arrivé là. Cette thèse lui est dédiée.

ABREVIATIONS

4-PBA : 4-phenyl butyric acid

AFLD : alcoholic fatty liver disease

AMBRA 1 : Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1

AMPK : adenosin monophosphate-activated kinase

ALT : alanine transaminase

AST : aspartate transaminase

ASH : alcoholic steatohepatitis

AOX : fatty acyl-CoA oxidase

ATF6 : activation transcription factor-6

Atg : autophagy related genes/ proteins

ATZ : Z variant of Alpha 1-antitrypsin

Bad : bcl-Associated Death Protein

Bax : bcl-2-Associated X Protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BiP: BiP, Ig heavy chain binding protein, connue aussi comme GRP78

Bif-1: BAX-interacting factor-1

Bik : BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing) protein

BimEL : Bcl-2-interacting mediator of cell death

BNIP3 : BCL2-adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3

BNIP3L : BCL2-adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 ligand

C-EBP : CCAAT-Enhancer-Binding Proteins

CHC : carcinome hépatocellulaire

CHOP/GADD153 : C-EBP Homologous Protein

ChREBP : carbohydrate response element binding proteins

CYP2E1 : cytochrome P450 2E1

DISC : Death Inducing Signaling Complex

eIF2α : Eukaryotic initiation factor 2

ERA : espèces réactives de l'azote

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FABP : fatty acid binding protein

Fas/CD95 : TNF receptor superfamily, member 6

FAT/CD36 : fatty acid translocase

FATP : fatty acid transport proteins

FFA : free fatty acids

FIP200 : RB1-inducible coiled-coil 1 protein

FoxO 1/3 : forkhead box O1/3

GRINA : glutamate receptor, ionotropic, NMDA-associated protein 1, glutamate binding

GRP78 : glucose-regulated protein, 78kDa

HDAC6: histone deacetylase-6 protein

HIFs : hypoxia-inducing factors

HPS70 : heat shock protein 70

JNK : c jun N Terminal Kinase

IL-1ra : interleukin 1 receptor antagonist

IL-6 : interleukin 6

iNOS : inducible nitric oxide synthetase

I/R : ischémie/reperfusion

IRE1 : inositol requiring enzyme-1

IRS 1-2 : insulin receptor substrate 1-2

LAMP 1-2 : lysosome-associated membrane protein 1-2

LC3 : light chain 3

MAP : mitogen activated protein kinases

MCFA : medium chain fatty acids

Mcl-1 : myeloid cell leukemia sequence 1

mTOR : mammalian target of rapamycin

NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease

NASH : non-alcoholic steatohepatitis

NFκB : nuclear factor kappa B

NO : nitric oxide

NOX1 : NADPH oxidase 1

Noxa/PMAIP: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

PARP :poly(ADP-ribose)polymérase

PERK : protein kinase RNA-like ER kinase

PHD1-3 : prolyl hydroxylases 1-3

PKC : phospho kinase C

PI : préconditionnement ischémique

PINK 1 : PTEN-induced putative kinase 1

PPARα,γ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

Puma: p53 upregulated modulator of apoptosis protein

RE: réticulum endoplasmique

RIP 1-3: Receptor-Interacting Protein Serine-Threonine Kinases 1-3

RXR: retinoid X receptor

Sirt1: sirtuin 1

SREBP-1c : sterol response element binding protein-1c

SOCS 1-3 : suppressors of cytokine signalling 1-3

SOD2 : superoxide dismutase 2

TG : triglycérides

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TUDCA : Tauroursodeoxycholic acid

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

ULK 1-2 : unc-51-like kinase 1

UPR : Unfolded Protein Response

UVRAG : UV radiation resistance associated gene protein

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channels

VLDL : very low density lipoproteins

Vps34 : Vps34 Phosphatidylinositol 3 Kinase

XBP1 : X-box binding protein 1

XD : xanthine déshydrogénase

XO : xanthine oxydase

RESUME

La stéatose hépatique est une pathologie qui peut constituer la première étape d'une evolution maligne vers le carcinome hépatocellulaire. Les interactions entre le métabolisme énergétique, la réponse inflammatoire tissulaire et les lésions subcellulaires determinent l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire, notamment en adaptation aux stress chroniques. Dans ce contexte, l'autophagie joue un rôle central et les altérations de son fonctionnement pourraient favoriser directement ou indirectement la cancérogenèse.

MOTS-CLES

Stéatose, autophagie, carcinome hépatocellulaire, cancer, foie

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Service de Biochimie et Biologie Moléculaire – INSERM U1004
Hôpital Paul Brousse 12, Av. Paul Vaillant-Couturier
94804 Villejuif
EA4530 Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire
Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

SOMMAIRE

INTRODUCTION 3

I. La stéatose hépatique : définition et épidemiologie 5

I.1 Hépatopathie alcoolique 5

I.2 Hépatopathie non alcoolique 6

II. Aspects biochimiques de la NAFLD 9

II.1 Augmentation de la disponibilité et de la synthèse des lipides 9

II.2 Diminution de la sécrétion et du catabolisme des lipides 10

II.3 Le rôle de l'inflammation dans la progression de la NAFLD 11

II.4 Les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant 14

II.5 L'insulino-résistance 17

III. Mécanismes de tolérance à la mort cellulaire en réponse à un stress chronique pour le maintien de l'homéostasie 21

III.1 La lipotolérance et la lipotoxicité 21

III.2 Le stress du réticulum endoplasmique : un carrefour entre maladie métabolique et inflammation 25

III.3 La nécrose : une mort cellulaire régulée 31

III.4 L'autophagie : mécanisme de tolérance à la mort cellulaire dans la NASH 35

IV. La tolérance à la mort cellulaire comme mécanisme impliqué dans la cancérogenèse hépatique 44

IV.1 Le préconditionnement ischémique comme modèle d'étude des mécanismes de tolérance à la mort cellulaire 45

IV.2 Le risque de cancérogenèse par un excès de tolérance aux stress chroniques 48

OBJECTIFS 53

RESULTATS ET DISCUSSION 55

I. Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire induits par un préconditionnement ischémique 55

I.1 Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire induits par un préconditionnement ischémique dans le parenchyme hépatique présentant une stéatose et/ou des atteintes vasculaires liées à un traitement par chimiothérapie 55

I.2 Etude des mécanismes de tolérance induits par le préconditionnement ischémique chez le donneur de greffons stéatosiques pour transplantation hépatique 70

I.3 Etude de l'intérêt clinique du préconditionnement ischémique dans la transplantation hépatique du lobe droit de donneurs vivants 81

II. Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire dans la stéatose impliquant des nouvelles cibles moléculaires 91

II.1 Revue de la littérature sur l'utilisation des approches moléculaires à haut débit pour l'étude de la pathogenèse et l'identification de marqueurs précoces des hépatopathies non-alcooliques 91

II.2 Etude du rôle d'une sous-unité du récepteur NMDA dans la régulation de la mort cellulaire dans la stéatohépatite non alcoolique 109

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 138

BIBLIOGRAPHIE 142

ANNEXES 168

INTRODUCTION

Le foie est un organe essentiel à la vie chez tous les mammifères. Il est un organe central du métabolisme énergétique et des substances xénobiotiques auxquelles l'individu est exposé. Le foie est la cible d'agressions diverses, telles que les virus, l'alcool, les substances chimiques présentes dans l'alimentation ou l'environnement de vie. Il subit également des transformations pathologiques profondes, lors du diabète ou de l'obésité.

Le parenchyme hépatique peut réagir à ces agressions de façon aigue aboutissant à une hépatite fulminante où la nécrose massive des hépatocytes provoque une insuffisance hépatique qui peut s'avérer létale en l'absence de transplantation. Cependant, on observe souvent une réponse chronique, caractérisée par le développement d'une stéatose ou par des degrés variables de nécrose hépatocytaire, d'infiltration tissulaire des cellules inflammatoires, et de fibrose. La progression de ces conditions pathologiques peut aboutir au développement d'une cirrhose hépatique voire d'un carcinome hépatocellulaire.

Les NAFLDs (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases) qui regroupent l'ensemble des lésions hépatiques de la stéatose simple, et souvent réversible, à la NASH (Non Alcoholic Stéatohepatitis) (Brunt & Tiniakos 2010), constituent un ensemble de pathologies dont l'incidence et la prévalence sont en constante augmentation tant dans les pays occidentaux que dans le reste de la planète. La NAFLD est destinée à devenir la première indication de transplantation hépatique dans un futur proche (Charlton 2011) et il est possible qu'une proportion de plus en plus importante des carcinomes hépatocellulaires se déclare dans un contexte de NAFLD (Page and Harrison 2009).

Les mécanismes pathogènes à l'origine de la progression d'une stéatose simple vers une pathologie hépatique plus sévère ne sont pas encore éclaircis. L'insulino-résistance et l'obésité sont les causes épidémiologiques associées à la NASH et au développement d'une cirrhose cryptogénique (sans causes sous jacentes reconnues). Une accumulation d'évidences expérimentales montre un réseau complexe d'interactions moléculaires qui lient le métabolisme hépatique et celui du tissu adipeux, la réponse inflammatoire systémique et tissulaire et des altérations subcellulaires, telles que les lésions des mitochondries et le stress du réticulum endoplasmique. Au cours de ces stress, les hépatocytes répondent par la mise en place de mécanismes de survie. Ces mêmes mécanismes, s'ils sont dérégulés, pourraient contribuer à la transformation d'une cellule normale en cellule pre-cancéreuse puis cancéreuse.

Notre travail est centré sur l'étude des mécanismes de tolérance à la mort cellulaire mis en place par les foies stéatosiques et leurs implications dans la chronicité et sévérité de la maladie et dans la cancérogenèse hépatique. Pour étudier ces mécanismes, nous nous sommes appuyés sur le modèle

du préconditionnement ischémique, un épisode d'ischémie-reperfusion brève avant une ischémie plus longue, décrit pour induire une tolérance aux altérations cellulaires de l'organe ischémié. Nous avons caractérisé des voies de signalisation impliquées dans la lutte contre l'apoptose ou la nécrose, comme celle activée par un stress du réticulum endoplasmique et venant contrer la mort apoptotique et inflammatoire liée à un excès de cytokines. Nous avons également montré que l'autophagie joue un rôle crucial dans la stéatohépatite pour le maintien de l'homéostasie cellulaire.

I. La stéatose hépatique : définition et épidémiologie

La stéatose hépatique est définie par une accumulation de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme d'au moins 5-10% hépatocytes, ceux-ci n'en contenant normalement que des traces non observables en microscopie optique (Burt et al 1998). Les causes de cette accumulation sont multiples : il peut s'agir d'une synthèse et/ou d'une disponibilité accrues de lipides ; d'une sécrétion et/ou d'un catabolisme de triglycérides diminué, ou bien d'une combinaison de ces altérations. Les triglycérides intra-hépatiques proviennent des plusieurs carrefours métaboliques. En effet, ils sont produits à partir des acides gras captés par le foie depuis le sérum, suite soit à une lipolyse du tissu adipeux soit à une augmentation quantitative des apports lipidiques alimentaires Ils peuvent également être issus de l'hydrolyse des triglycérides sériques. Le foie est le siège de la synthèse *de novo* des acides gras qui peut être accrue en présence d'un diabète ou d'une consommation excessive d'alcool. Au niveau hépatique, on peut observer également une oxydation anormale des acides gras dans le cas de mitochondries endommagées et une détérioration du transport systémique d'acides gras *via* la sécrétion de protéines à très basse densité (VLDL) en cas de malnutrition, d'action des toxines ou de prise de médicaments (Fabbrini et al 2010).

Deux entités distinctes de stéatose sont décrites en fonction de la notion, ou non, de la consommation abusive d'alcool du patient : on distingue la stéatose alcoolique (alcoholic fatty liver disease, AFLD) de la stéatose non alcoolique (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) (Ludwig et al 1980, O'Shea et al 2010, Lewis & Mohanty 2010).

La stéatose est généralement considérée comme une lésion bénigne, mais elle peut constituer la première étape de la progression d'une hépatopathie (alcoolique ou non alcoolique) vers un large spectre de lésions hépatiques qui vont de la stéatohépatite (une stéatose accompagnée de lésions hépatocellulaires, d'une inflammation chronique et d'une fibrose) jusqu'à la cirrhose (Leclercq & Sempoux 2006).

I.1 Hépatopatie alcoolique

L'hépatopathie alcoolique (Alcoholic Liver Disease, ALD) représente probablement la plus ancienne forme de maladie hépatique du genre humain (Patrick 1952) et l'alcool reste encore une cause majeure de maladie hépatique dans le monde.

Les caractéristiques histologiques des lésions induites par l'alcool varient en fonction du degré et de l'extension des lésions. Ces lésions comprennent la stéatose («foie gras»), l'inflammation lobulaire, la fibrose périportale, les corps de Mallory (des agrégats des cytokératines, filaments

intermédiaires et d'autres protéines), la vacuolisation des noyaux, la prolifération des canaux biliaires, et la fibrose ou cirrhose (Lefkowitch 2005).

Les données disponibles sur l'ALD sont assez solides pour pouvoir décrire la pathophysiologie de la maladie. Les facteurs pouvant influencer le développement de la pathologie sont la quantité, la durée et le type de consommation d'alcool ; les modalités de consommation ; le sexe ; l'ethnie ; d'autres facteurs de risque comme l'obésité, la surcharge en fer, une infection virale concomitante ainsi que des facteurs génétiques (O'Shea et al 2010).

Les pathologies alcooliques du foie sont connues depuis très longtemps et la prévention des abus de consommation reste la meilleure stratégie pour en diminuer leur impact. Nous nous sommes focalisés sur les Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD), dont l'incidence et la prévalence ne cessent d'augmenter au cours des dernières décennies (Williams et al 2011).

I.2 Hépatopatie non alcoolique

L'hépatopathie non alcoolique (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) est un ensemble de désordres qui vont de la stéatose simple jusqu'à la NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis) et la cirrhose. Le terme NASH provient des travaux de Ludwig et al qui en 1980 (Ludwig et al 1980) décrivaient des altérations histologiques telles que stéatose, infiltrats inflammatoires, corps de Mallory, fibrose et cirrhose dans une série de 20 patients sans histoire avérée de consommation d'alcool (Ludwig et al 1980).

La NAFLD est une maladie de l'âge adulte, souvent diagnostiquée après 40 ans, bien que cette condition soit également décrite dans la population pédiatrique, mais avec des caractéristiques pathologiques distinctes par rapport à celles observées chez l'adulte (on observe une fréquence moindre d'hépatocytes ballonnisés, de fibrose péricentrale, d'inflammation parenchymateuse) (Loomba et al 2009). La NAFLD est plus fréquente chez les hommes, les obèses morbides et les populations asiatiques et hispaniques (Arun et al 2006, Weston et al 2005, Browning et al 2004). La NAFLD est constamment associée à l'obésité, au diabète de type 2 et aux dyslipidémies (Leclerq & Sempoux 2006, Marchesini et al 2003). Des études récentes rapportent une association entre NAFLD et athérosclérose, suggérant que des médiateurs inflammatoires communs peuvent provoquer à la fois une atteinte du parenchyme hépatique et des vaisseaux périphériques (Brea et al 2005, Kim et al 2009).

Bien que les données épidémiologiques sur la NAFLD soient récentes et fragmentaires, la prévalence a été estimée de 17 à 33% pour la stéatose dans la population générale (McCullough 2004). On peut effectivement observer une différence de prévalence de la stéatose entre les sujets de poids normal, pour lesquels l'estimation varie de 16 à 20% (Bellentani et al 2000), et les sujets

obèses, pour lesquels l'estimation varie de 60 à 86% (Ruhl et al 2003, Marceau et al 1999). Des études sur les foies des sujets décédés dans des accidents de la voie publique rapportent des chiffres de prévalence similaires, avec de 16 à 24% des foies présentant une stéatose (Hilden et al 1977, Ground 1982). En ce qui concerne la prévalence de la NASH, une estimation a été calculée avec une fourchette entre 5,7 et 16,5% (McCullough 2004). Les études précédemment citées sur les données issues de prélèvements d'autopsie ont montré une prévalence moindre de la NASH entre 2,1 et 2,4% (Hilden et al 1977, Ground 1982). Une autre étude d'autopsies conduites à l'Hôpital Général de Toronto sur 351 personnes consécutives a retrouvé une NASH chez 18,5% des sujets obèses et 2,7% des sujets de poids normal (Wanless & Lentz 1990). Cependant, ces études ont été conduites entre à la fin des années 70 et le début des années 90, avant l'épidémie d'obésité et diabète de type II que l'on observe depuis dans les pays occidentaux. Une étude prospective sur 328 personnes (âge moyen de 54 ans) basée sur un questionnaire, une échographie du quadrant supérieur droit et une biopsie hépatique chez les sujets dont l'échographie était positive a été publiée récemment (Williams et al 2011). La prévalence de la NAFLD était de 46% et la prévalence globale de la NASH de 12,2%, celle-ci augmentant à 29,9% chez les patients ayant un foie stéatosique. L'étude confirme que la NAFLD et la NASH sont plus souvent retrouvées chez les hommes, âgés, obèses ou en surpoids, avec des antécédents d'hypertension et de diabète. D'ailleurs, les patients atteints de NAFLD consommaient plus fréquemment des repas au *fast food* et avaient une activité physique moindre (Williams et al 2011). La prévalence globale de la NASH, retrouvée par ces auteurs est supérieure à celle retrouvée dans les études précédentes, et les patients présentant une NASH avancée (fibrose 2-4) représentaient 2,7% de la cohorte analysée (Wanless & Lentz 1990, Charlton 2011). Ces résultats indiquent que la NAFLD et ses complications sont destinées à devenir l'indication principale de transplantation hépatique dans un futur proche (Charlton 2011).

Les caractéristiques histologiques de la NAFLD sont proches à celles de l'ALD. Les altérations hépatiques ne sont pas nécessairement des étapes distinctes dans l'évolution de la pathologie, car elles peuvent co-exister chez un même patient (Lefkowitch 2005, Mendez-Sanchez et al 2005). Les lésions histologiques sont généralement divisées en 3 stades : stéatose simple, hépatite, et hépatite chronique associée à la fibrose hépatique ou à la cirrhose (MacSween & Burt 1986, O'Shea et al 2010). La stéatose simple est typiquement asymptomatique, mais elle peut être associée à une inflammation (Brunt & Tiniakos 2010). La constatation d'une stéatose touchant au moins 5% des hépatocytes est obligatoire pour le diagnostic de NAFLD, tandis qu'elle n'est pas nécessaire pour le diagnostic de l'ALD (Brunt & Tiniakos 2010). Les corps de Mallory-Denk sont typiquement plus fins, épars et moins nombreux dans la NAFLD par rapport à l'ALD, alors que les noyaux chargés en glycogène sont retrouvés plus fréquemment dans la NASH que dans l'ASH (Tiniakos 2009). Les

lésions occlusives des veines hépatiques, la cholestase aigue/chronique ou la cholangite sont actuellement considérées comme des lésions ne se développant que dans un contexte d'ALD (Tiniakos 2009).

Les connaissances de l'histoire naturelle de la NAFLD sont limitées par la description récente de la maladie et par la petite taille des échantillons (Dam-Larsen et al 2004, Teli et al 1995). Une étude rétrospective américaine conduite sur 435 patients suivis pendant 7,6 années a montré que 3% de patients initialement atteints de NAFLD ont développé une cirrhose (Adams et al 2005). Dans une étude prospective, Fassio et al ont montré que 30% des patients avec NASH progressent vers une fibrose avant 5 ans (Fassio et al 2004). Chalasani (2008) suggère que les limites des études ne permettent pas de conclure au caractère bénin de la stéatose (Chalasani, 2008). De nombreuses études et *case reports* ont mis en évidence un lien direct entre la NAFLD et le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Powell et al 1990, Marrero et al 2002, Sorensen et al 2003, Hashizume et al 2007, Hashimoto 2009). Dans une étude danoise, le risque de développer un cancer primitif sur un foie ayant une NAFLD était élevé avec un risque relatif standardisé de 4,4 (Sorensen et al 2003). Dans une étude cas-contrôle japonaise, 34 patients ayant une NASH et un CHC ont été comparés à 348 patients ayant une NASH sans CHC. Les résultats ont montré que l'âge et une fibrose plus avancée étaient des facteurs de risque importants pour le développement d'un CHC (Hashimoto 2009). Les études de cohortes que les auteurs avaient menées en parallèle de 1990 au 2007 ont montré chez les patients ayant une NASH une incidence cumulative de CHC à 5 ans de 7,6%, montrant que le CHC était la cause principale de mortalité chez ces mêmes patients (Hashimoto 2009). De nombreux *case reports* ont été publiés et récemment résumés reliant 67 cas de CHC dans un contexte de NASH. La plus part des cas se développait chez des hommes (66%), obèses (58%) et diabétiques (64%) et, de façon surprenante, dans 33% des cas, le CHC se développait en l'absence de cirrhose (Page & Harrison 2009).

II. Aspects biochimiques de la NAFLD

II.1 Augmentation de la disponibilité et de la synthèse des lipides

La résistance à l'insuline est considérée une étape clé dans l'accumulation des lipides au niveau hépatique et donc dans l'initiation de la NAFLD. Dans des conditions d'insulino-résistance, le tissu adipeux et le muscle oxydent de préférence les lipides, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d'acides gras libres dans la circulation sanguine. (Leclerq & Sempoux 2006, Lewis & Mohanty 2010) Le tissu adipeux joue un rôle important dans l'homéostasie systémique des lipides et du glucose. Dès que sa capacité à estérifier les acides gras provenant de la circulation sanguine et à les stocker au sein des adipocytes est dépassée (ce qui se produit en cas d'excès alimentaire riche en graisses et sucres et en cas d'insulinorésistance), les acides gras libres sont délivrés au foie, provoquant une stéatose (Lewis et al 2002).

La disponibilité hépatique des lipides dépend aussi de l'expression des certains transporteurs d'acides gras, comme les *fatty acid transport proteins* (FATP), la *fatty acid translocase* (FAT/CD36), la caveoline-1 et la *fatty acid binding protein* (FABP) (Canbay et al 2007). L'activation des facteurs de transcription, tels que les *carbohydrate responsive element binding proteins* (ChREBP), la *sterol response element binding protein-1c* (SREBP-1c), *forkhead box 01* (Fox01), ou certains récepteurs nucléaires comme PPAR-γ et RXR, induit la synthèse hépatique d'acides gras (Canbay et al 2007).

Il semble maintenant clair qu'un dysfonctionnement dans le contrôle du métabolisme global des lipides joue un rôle majeur dans l'initiation et la persistance de la NAFLD (Fabbrini et al 2010). Des études *in vivo* chez l'homme montrent qu'environ 60% des acides gras composant les triglycérides hépatiques proviennent du tissu adipeux blanc (Donnelly et al 2005). Récemment, il a été montré que la quantité d'acides gras libérés dans la circulation sanguine est proportionnelle à la masse grasse tant chez l'homme que chez la femme, ce qui implique que la quantité d'acides gras libres par rapport à la masse maigre est supérieure chez les sujets obèses par rapport aux sujets de poids normal (Mittendorfer et al 2009). D'autres résultats montrent une expression augmentée de certaines protéines chez les sujets obèses avec une NAFLD, comme les lipases hépatiques ou bien le transporteur FAT/CD36, permettant l'absorption des acides gras du plasma tant au niveau hépatique que musculaire (Greco et al 2008, Fabbrini et al 2009). De surcroît, l'hyperinsulinémie peut, à elle seule, stimuler l'accumulation de lipides au niveau hépatique, activant la synthèse *de novo* des acides gras (lipogenèse) *via* le facteur de transcription SREBP-1c, qui active la plupart des gènes impliqués dans la lipogenèse (Wanless et al 1989). Enfin, il est intéressant de noter que la contribution de la lipogenèse à la production de triglycérides (TG) intrahépatiques est limitée chez

les sujets normaux et rend compte pour 5% des acides gras délivrés dans les protéines VLDL. En revanche, chez les sujets atteints de NAFLD la contribution de la lipogenèse est beaucoup plus importante et rend compte pour 15-23% des acides gras délivrés dans les protéines VLDL (Diraison et al 2003, Donnelly et al 2005).

II.2 Diminution de la sécrétion et du catabolisme des lipides

Une élimination insuffisante des lipides par sécrétion des VLDL ou par β-oxydation ne semble pas jouer un rôle important dans l'accumulation de lipides dans la NAFLD (Lewis et al 2002, Ferré & Foufelle 2010). Cependant, certaines conditions peuvent altérer la sécrétion des lipoprotéines synthétisées au niveau hépatocytaire. Il a été montré que certains acides gras à chaîne moyenne (*medium chain fatty acids*, MCFA), comme l'octanoate, le décanoate, et le dodécanoate, diminuent la sécrétion de la lipoprotéine apoB dans des hépatocytes de poulet (Sato et al 2005). D'ailleurs, dans un modèle de NAFLD induit par un régime riche en graisses chez le rat, il a été observé une altération de l'assemblage de VLDL et du transport de TG au réticulum endoplasmique (RE) (Cano et al 2009).

En ce qui concerne la cinétique de sécrétion des protéines VLDL, la plupart des études a montré une sécrétion de VLDL supérieure chez les sujets avec NAFLD par rapport aux sujet sains, bien que le dysfonctionnement soit associé dans certaines conditions à une augmentation des TG intra-hépatiques (Adiels et al 2006, Fabbrini et al 2008). De façon intéressante, Fabbrini et al (2008) rapportent que la sécrétion de VLDL augmente linéairement avec la concentration de TG intrahépatiques chez les sujets sans NAFLD, tandis que cette sécrétion atteint un plateau chez les sujets avec NAFLD. Les mécanismes responsables de ce phénomène ne sont pas connus, mais ils peuvent être dus à une taille de VLDL excédant le diamètre de sinusoïdes qui empêcherait leur libération par les hépatocytes (Horton et al 1999). Quant à l'oxydation hépatique des acides gras, bien que des données issues des modèles animaux montrent que son augmentation diminue l'accumulation de lipides dans le foie et, vice-versa, son inhibition induit une stéatose hépatique (Zhang et al 2007, Stefanovic-Radic et al 2008), les données chez l'homme, plus difficiles à obtenir, montrent une oxydation des acides gras normale ou augmentée chez les patients avec NAFLD (Bugianesi et al 2005, Kotronen et al 2009).

La β-oxydation des acides gras se produit au niveau mitochondrial et peroxysomal, mais les acides gras à chaînes supérieures à 20 carbones sont aussi métabolisés au niveau du RE par le cytochrome P450 CYP4A pour être ensuite délivrés au peroxysome (Hashimoto et al 1999). D'ailleurs, la mitochondrie est le compartiment où la majorité des acides gras est oxydée et des altérations structurelles et fonctionnelles des mitochondries sont souvent rencontrées dans les foies

stéatosiques (Fabbrini et al 2010). Les gènes qui codent pour des enzymes clés de la β-oxydation mitochondriale, microsomiale et peroxysomiale sont sous le contrôle du facteur de transcription nucléaire PPAR-α. Des souris knock-out pour PPAR-α montrent une diminution constitutive de la β-oxydation mitochondriale et développent une macrostéatose localisée au niveau centrolobulaire. Si, à cette perte de fonction, est associée une délétion des allèles du gène qui code pour l'enzyme clé de la β-oxydation peroxysomiale (fatty acyl-CoA oxidase, AOX), une stéatohépatite microvesiculaire est observée (Hashimoto et al 1999). Ces résultats montrent que PPAR-α et AOX peuvent effectivement jouer un rôle important dans le métabolisme lipidique au niveau hépatique et dans la pathogenèse de certains phénotypes de NAFLD (Hashimoto et al 1999).

II.3 Le rôle de l'inflammation dans la progression de la NAFLD

La pathogenèse de la NAFLD reste basée sur l'hypothèse «two hits» proposée en 1998 (Day & James 1998) et récemment réactualisée comme une hypothèse «multi-hits» (Lewis & Mohanty 2010) (Figure 1).

Les mécanismes impliqués dans la progression de la stéatose vers l'inflammation et la fibrose restent encore à élucider, bien que certaines facteurs soient connus depuis longtemps, comme une vulnérabilité accrue des hépatocytes stéatosiques, une altération de l'état inflammatoire systémique, un dysfonctionnement mitochondrial, un excès de stress oxydant et une insulino-résistance qui, au-delà de conséquences métaboliques déjà citées, est responsable de l'altération de la production des adipokines par le tissu adipeux, donnant lieu à un état pro-inflammatoire et probablement profibrotique (Figure 2) (Leclerq & Sempoux 2006).

Les foies stéatosiques sont connus pour être plus vulnérables aux stress que les foies normaux. Ces connaissances sont issues essentiellement des travaux de chirurgie expérimentale et humaine (Selzner & Clavien 2001, Peralta et al 2001, El-Badry et al 2007). La stéatose est associée à une diminution de la synthèse d'ATP et à un flux sinusoïdal perturbé (Peralta et al 2001). D'autres facteurs peuvent contribuer à cette vulnérabilité comme les altérations de la fonction des cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie, et l'adhérence de leucocytes (Farrell et al 2008). De plus, les foies stéatosiques souffrant principalement d'une mort cellulaire par nécrose ont une tolérance réduite aux dommages de l'ischémie/reperfusion, (Selzner & Clavien 2001), pouvant contribuer à augmenter l'intensité de la réponse inflammatoire (VanSaun et al 2009).

Il semble de plus en plus évident qu'il existe, dans la NAFLD, une connexion étroite entre l'activité sécrétoire du tissu adipeux et la réponse inflammatoire systémique et, plus particulièrement, hépatique (Feldstein 2010). Au cours des dernières années, il a été montré que le tissu adipeux n'est pas simplement un organe de stockage

des lipides, mais un tissu ayant une activité endocrine et des fonctions immunitaires importantes (Tilg & Moschen 2010).

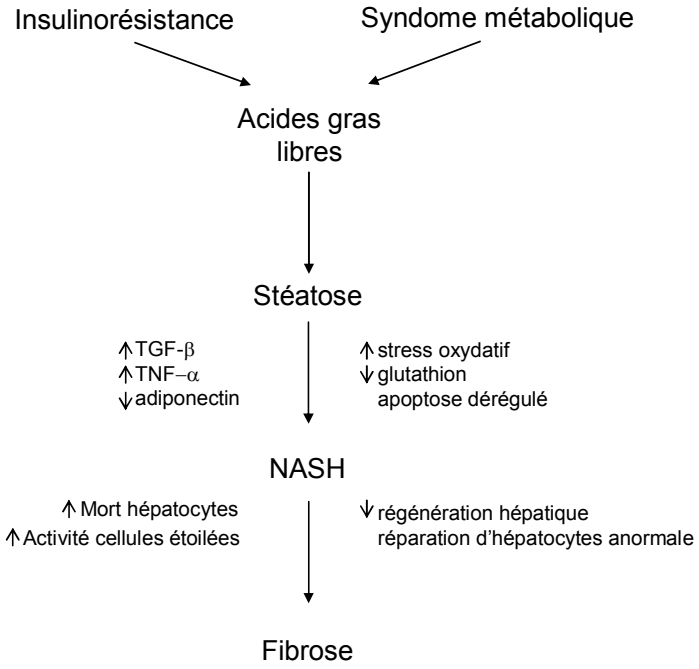


Figure 1. Pathogenèse de la NAFLD : hypothèse «multi-hit». Dans ce modèle, un métabolisme dérégulé des acides gras libres («first hit») induit une accumulation de lipides dans le foie (stéatose). Des médiateurs inflammatoires, des espèces réactives de l'oxygène et une altération de l'apoptose constituent des «second hits» caractérisés par la survenue d'une inflammation (NASH). L'interaction entre les médiateurs inflammatoires et les cellules étoilées peut générer une fibrose qui, en l'absence de contrôle, peut surpasser les capacités régénératives du foie et progresser vers une cirrhose. Adaptée de Lewis & Mohanty 2010.

L'adiponectine est une adipocytokine anti-inflammatoire dont la signalisation est médiée par deux récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2. Le lien entre l'adiponectine et AdipoR1 permet un influx du Ca^{2+} extracellulaire nécessaire à l'activation de l'adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) et de la protéine Sirtuin 1 (Sirt1), une déacétylase, dont l'action combinée protège de la stéatose et de l'inflammation hépatique (Yamauchi et al 2007). L'adiponectine peut donc jouer un rôle central dans l'équilibre local et systémique de l'inflammation, permettant la prévention de l'inflammation hépatique (Tilg & Hotamisligil 2006).

La leptine est une adipokine qui stimule l'oxydation des acides gras dans les tissus périphériques, notamment dans le foie, diminuant l'expression du facteur de transcription lipogénique SREBP-1 (Unger 2002, Kakuma et al 2000). Néanmoins, la leptine semble participer au développement de la NASH. Elle semble contribuer à l'insulino-résistance hépatique et, par

conséquent, à l'établissement de la stéatose (Tsochatzis et al 2009). De plus, elle a un rôle pro-inflammatoire et est considérée comme un médiateur essentiel de la fibrose hépatique (Tsochatzis et al 2006).

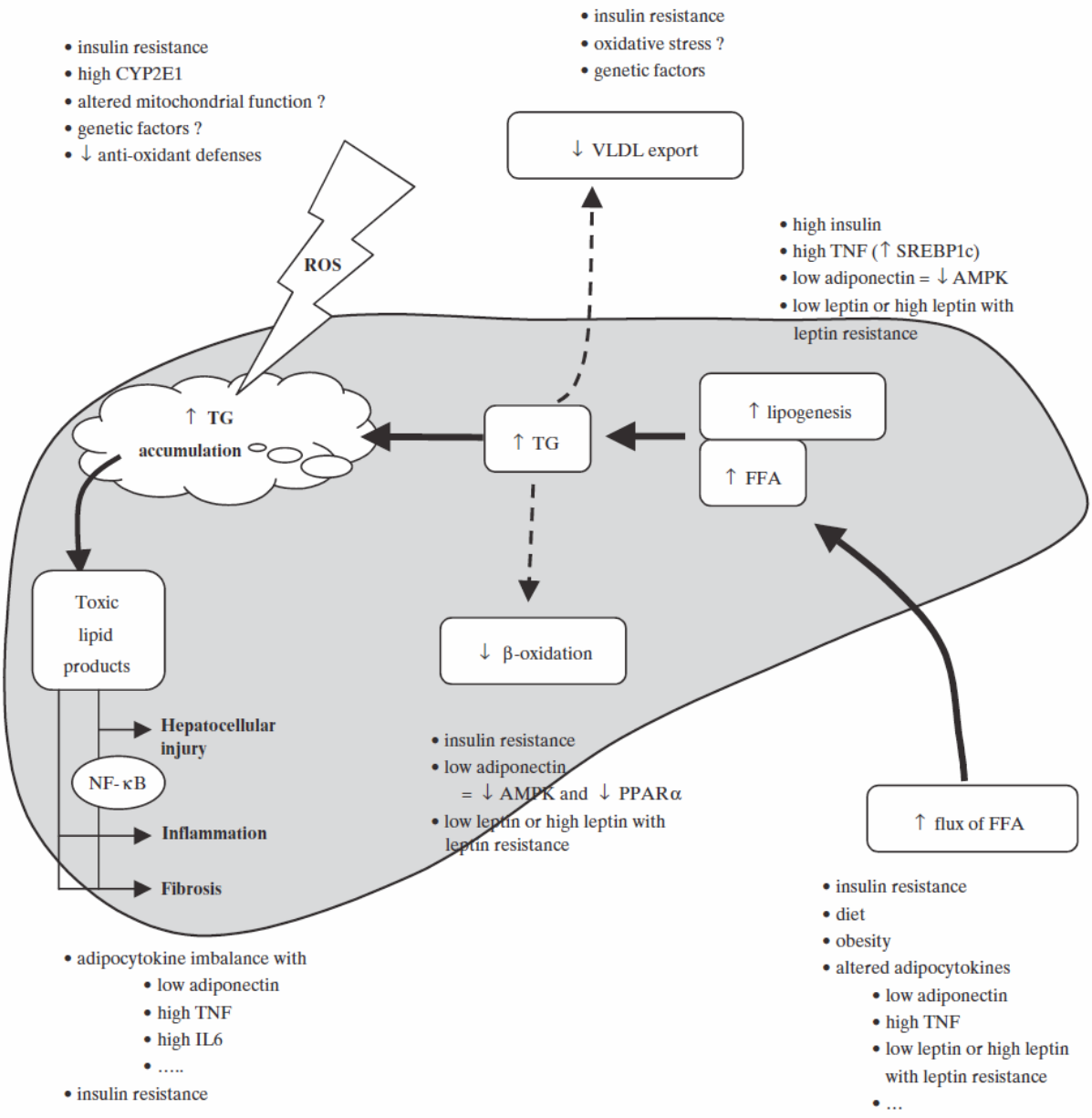


Figure 2. Représentation schématique des facteurs impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD. TG : triglycérides; FFA : acide gras libres; ERO : espèces réactives de l'oxygène; VLDL : lipoprotéines à très basse densité (Par Leclerq & Sempoux 2006).

L'expression du Tumor Necrosis Factor α (TNFα) et de l'interleukine 6 (IL-6), deux cytokines proinflammatoires majeures, est augmentée dans le tissu adipeux des sujets obèses et insulino-résistants (Hotamisligil et al 1993). Un déséquilibre des adipocytokines, notamment du ratio TNFα

/adiponectine, semble jouer un rôle important dans la progression de la stéatose à la NASH (Feldstein 2010). Le TNFα a un rôle lipogénique, induisant SREBP-1 (You et al 2005). De plus, les souris génétiquement déficientes pour le récepteur TNFR1 sont résistantes au développement d'une NASH induite par deux types de régime, et le traitement des souris déficientes en leptine (*ob/ob*) avec un anticorps anti TNFα, améliore la stéatose et l'insulino-résistance hépatiques (Feldestein et al 2004). En ce qui concerne le rôle de l'IL-6, la situation semble être plus complexe. En effet, certaines études avaient montré initialement un rôle hépatoprotecteur pour cette cytokine, dans le contexte du préconditionnement ischémique et dans les foies stéatosiques, grâce à son effet antioxydant (El Assal et al 2004, Teoh et al 2006), mais une autre étude a montré qu'il existe une différence d'effet entre une exposition courte et une exposition chronique à l'IL-6, la dernière rendant le foie plus sensible à la mort apoptotique (Jin et al 2006). Cependant, le rôle exact de l'IL-6 dans la pathogenèse de la NASH reste à élucider (Tsochatzis et al 2009, Feldestein 2010).

II.4 Les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant

Le stress oxydant constitue une condition de déséquilibre de la balance entre espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) et les défenses antioxydantes de la cellule, en faveur des espèces oxydantes. Cette condition se produit dans la stéatose où elle est considérée comme centrale dans la pathogenèse de la NASH et dans sa progression vers la fibrose/cirrhose (Videla et al 2004, Seki et al 2002). Les ERO ont des effets délétères qui sont connus depuis des décennies : la peroxydation lipidique, qui rend les membranes cellulaires instables et fragiles ; l'oxydation des protéines qui altère leur fonctions et qui peut causer la formation d'agrégats cytotoxiques ; l'oxydation des acides nucléiques avec un risque accru de formation des mutations génomiques. Récemment, il a été montré que les ERO peuvent avoir différentes fonctions dans la signalisation cellulaire, en stimulant la prolifération ou la différenciation, ou encore en déclenchant des réponses adaptatives en fonction de l'intensité oxydative (due à la fois à la concentration en ERO et à la durée de leur production intracellulaire) (Hamanaka & Chandel 2010). Parmi les voies de signalisation dans lesquelles les ERO jouent un rôle crucial et qui sont impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD, on peut citer la réponse cellulaire à l'hypoxie (Chandel et al 1998, Bell et al 2007), la régulation de l'activité des phosphatases (Kwon et al 2004), et la mort cellulaire induite par TNF-α (Kamata et al 2005).

L'hypoxie conduit initialement à l'activation d'un programme transcriptionnel adaptatif afin de réduire la consommation d'oxygène et d'énergie. De façon paradoxale, l'hypoxie augmente la production des ERO mitochondriaux, mais des résultats récents montrent que c'est effectivement la production de H_2O_2, au cours de l'hypoxie, qui régule en amont la réponse cellulaire (Chandel et al

1998, Bell et al 2007). La réponse cellulaire à l'hypoxie nécessite l'induction des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIFs). Ils consistent en une sous-unité stable (HIF β) et trois sous-unités labiles (HIF1-3-α) (Weidemann & Johnson 2008). Au cours de l'hypoxie, les sous-unités HIF-α, normalement dégradées, sont stabilisées, ce qui permet la translocation nucléaire du facteur de transcription et l'activation de l'expression des gènes régulant l'érythropoïèse, la glycolyse, l'angiogenèse, le cycle et la survie cellulaires (Weidemann & Johnson 2008). Le *turnover* normoxique des sous-unités HIF-α nécessite une hydroxylation directe des prolines, modification qui permet sa dégradation par le système du protéasome. Cette hydroxylation est réalisée par une famille de prolyl hydroxylases 1, 2, 3 (PHD1-3), dont l'activité est inhibée pendant l'hypoxie par les ERO mitochondriaux. Au delà de la régulation transcriptionnelle, l'exposition des cellules aux faibles concentrations d'oxygène induit une diminution de la consommation énergétique, en supprimant réversiblement, par endocytose, l'activité de la Na/K ATPase, le transporteur de sodium et potassium qui maintient le gradient ionique de la cellule. La suppression de l'activité de cette enzyme nécessite l'activité de l'AMPK (Gusarova et al 2009). Les ERO mitochondriaux activent l'AMPK au cours de l'hypoxie et cette activation permet la phosphorylation de la protéine kinase C zêta (PKCζ), qui phosphoryle la sous-unité α de la Na/K ATPase, conduisant à l'endocytose du complexe (Dada et al 2003).

Les ERO régulent aussi l'activité des phosphatases, enzymes clés dans la signalisation cellulaire ayant une activité opposée à celle des kinases. Les phosphatases ont un résidu de cystéine oxydable au sein de leur site catalytique, ce qui en fait une cible de l'action des ERO (Hamanaka & Chandel 2010). Certaines phosphatases sont impliquées dans la pathogenèse de la NASH. D'ailleurs, les souris déficientes en phosphatase and tensin homolog (PTEN) développent des lésions hépatiques correspondant à la NASH humaine (Anezaki et al 2009).

Les ERO mitochondriaux sont des acteurs majeurs dans la mort cellulaire induite par TNF-α, ce qui, comme nous l'avons décrit auparavant, peut être un des mécanismes qui permet la progression de la NAFLD. Le TNFα peut promouvoir soit la survie soit la mort d'une cellule (Aggarwal 2003). Le TNFα active deux types de récepteurs, l'un d'entre eux permet la survie à travers l'action du facteur de transcription NFκB (Micheau & Tschopp 2003), tandis que l'autre active la kinase JNK qui est un médiateur central des signaux pro-apoptotiques médiés par le TNFα. A la suite du lien du TNFα à ces récepteurs, JNK est activé rapidement, mais transitoirement, bien qu'en l'absence de NFκB, son activation soit prolongée et entraîne la mort cellulaire (Liu et al 1996, Tang et al 2001). Or, l'inhibition de JNK médiée par NFκB passe par l'induction de la protéine antioxydante mitochondriale, la superoxyde dismutase 2 (SOD2) (Kamata et al 2005). En effet, le TNFα

augmente la production des ERO mitochondriaux qui inactivent les phosphatases de JNK, permettant son activation soutenue et la mort cellulaire : la SOD2 permet d'atténuer cette signalisation en diminuant la concentration en ERO mitochondriaux (Kamata et al 2005).

Au cours des dernières années, la participation des mitochondries à la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH a été explorée (Pessayre & Fromenty 2005). Des évidences s'accumulent quant au rôle d'un dysfonctionnement mitochondrial, notamment une déficience de la chaîne respiratoire, dans la physiopathologie de la NASH, indépendamment de sa cause initiale (Begriche et al 2006, Rector et al 2010).

Des études portant sur des patients obèses, diabétiques ou atteints de NASH ont montré des anomalies fonctionnelles et structurelles des mitochondries hépatiques (Spahr et al 2003, Sanyal et al 2001). Il est désormais évident que les mitochondries hépatiques sont une source significative d'ERO dans la NASH (Figure 3) (Begriche et al 2006).

Dans le foie des patients insulino-résistants, l'activité accrue de la β-oxydation augmente le flux d'électrons de la chaîne respiratoire (Pessayre & Fromenty 2005). Les adipocytes de personnes obèses libèrent des quantités importantes de TNF-α, qui, en se liant à son récepteur hépatique, peut induire la perméabilisation des mitochondries et une libération partielle du cytochrome c de l'espace inter-membranaire (Hotamisligil et al 1993). Le déséquilibre entre un apport élevé et un flux diminué d'électrons peut être la cause d'une réduction excessive des complexes I et III de la chaîne respiratoire, qui peuvent ainsi réagir directement avec l'oxygène produisant des ERO, notamment l'ion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (Begriche et al 2006). Le superoxyde peut être dismuté par la superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse (MnSOD) et oxyder les acides gras insaturés accumulés dans le foie en déclenchant la peroxydation lipidique. Le superoxyde, en présence d'oxyde nitrique (NO), peut également donner naissance au radical peroxynitrique ($ONOO^-$), espèce radicalaire de l'azote (ERA), responsable de la nitrosation de lipides et protéines. Les ERO, les ERA et les produits réactifs de la peroxydation lipidique (aldéhyde) peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les mutations de l'ADNmt peuvent produire des altérations des protéines de la chaîne respiratoire, causant une détérioration du transfert des électrons en augmentant encore plus la production des ERO mitochondriales, générant ainsi un cercle vicieux. Bien que la plupart des études se focalise sur les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire, il a été montré récemment qu'une expression ectopique du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) au niveau mitochondrial peut également jouer un rôle non négligeable (Raza et al 2004, Bansal et al 2010).

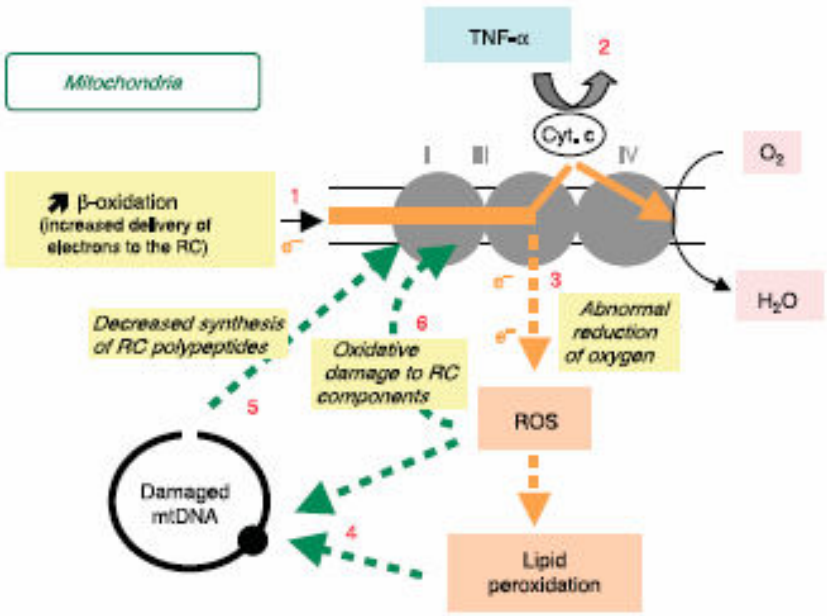


Figure 3. Altérations de la chaîne respiratoire (CR) mitochondriale dans les maladies métaboliques. Dans le foie d'un patient insulino-résistant, on observe une activité élevée de la β-oxydation qui augmente l'apport d'électrons dans la CR (flèche 1). Le tissu adipeux des sujets obèses libère des grandes quantités de TNF-α, dont la signalisation hépatique contribue à la perméabilisation des mitochondries (flèche 2). Le déséquilibre entre un apport élevé et un flux normal peut causer une réduction excessive des complexes I et III de la CR. Ces complexes trop réduits peuvent réagir avec l'oxygène et former des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (flèche 3). Les ERO oxydent les acides gras insaturés dans le foie, déclenchant une peroxydation lipidique. Les ERO, les espèces réactives de l'azote (ERA) et les produits réactifs de la peroxydation lipidique (aldéhydes) peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial (mtDNA) (flèche 4). Les altérations de l'ADN mitochondrial peuvent résulter en une diminution de la synthèse de protéines de la CR (flèche 5). D'ailleurs, les protéines mitochondriales peuvent être la cible des ERO, des ERA et des produits de la peroxydation lipidique (flèche 6), générant un cercle vicieux. (Begriche et al 2006)

La compréhension du rôle physiopathologique de la mitochondrie est donc incontournable pour le développement des stratégies préventives et thérapeutiques visant à lutter contre la NAFLD et sa progression.

II.5 L'insulino-résistance.

Depuis sa définition dans les années 80 (Ludwig et al 1980), de nombreuses études ont été conduites pour comprendre la pathogenèse de la NAFLD et sa progression chez certains patients vers des formes d'hépatopathies plus agressives, comme la NASH, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). L'insulino-résistance est considérée comme le facteur physiopathologique majeur qui caractérise la NAFLD (Bugianesi et al 2005b), bien que les liens entre l'insulino-

résistance, la pathogenèse et la progression de la NAFLD sont complexes et restent encore à élucider. Bien que le terme soit classiquement utilisé pour décrire une consommation de glucose insuffisante par le muscle squelettique suite à une stimulation de l'insuline, l'insulino-résistance associée à la NAFLD et à l'obésité s'accompagne d'une sécrétion globale d'insuline plus élevée et d'une extraction hépatique de l'insuline normale, mais avec une signalisation altérée tant au niveau hépatique (notamment une suppression insuffisante de la gluconéogenèse) qu'au niveau du tissu adipeux (notamment un suppression insuffisante de la lipolyse) (Fabbrini et al 2010). Dans les conditions physiologiques, après l'ingestion d'un repas contenant du glucose, environ 80% est métabolisé par le muscle, qui le stocke sous forme de glycogène (70% du glucose absorbé) ou l'oxyde via la glycolyse pour une utilisation immédiate. Le maintien normal de l'homéostasie du glucose est régulé par : 1) la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas ; 2) la stimulation de l'absorption de glucose par l'intestin, le foie et le muscle ; et 3) la suppression de la libération de glucose par le foie. Bien que le tissu adipeux ne soit responsable que d'une petite fraction d'élimination du glucose (environ 5%), son rôle reste central dans le maintien de l'homéostasie systémique du glucose (Bugianesi et al 2005b). Pour approfondir le rôle de l'insulino-résistance comme facteur indépendant de la NAFLD, un groupe italien a mené une étude sur des patients atteints de NAFLD mais sans aucun caractère de syndrome métabolique. Les résultats montrent que l'insulino-résistance altère significativement la lipolyse, l'oxydation lipidique et l'absorption totale du glucose dans ses deux composantes oxydative et non-oxydative (glycogènogenèse), (Bugianesi et al 2005a). Les auteurs ont trouvé une corrélation entre l'augmentation de l'oxydation lipidique et la diminution de l'absorption du glucose, ce qui suggère que le défaut métabolique, à l'origine d'une lipolyse accélérée, est responsable d'une augmentation de la fourniture d'acides gras libres au foie et d'une oxydation lipidique accrue. (Bugianesi et al 2005a). Ces résultats corroborent l'hypothèse d'une implication directe de l'altération de la signalisation de l'insuline dans l'établissement d'une NAFLD.

Au niveau moléculaire, les mécanismes responsables de l'insulino-résistance restent encore peu compris. Si plusieurs mécanismes ont été proposés, tels qu'une production anormale d'insuline ou des mutations au niveau du récepteur et des ses substrats, il est de plus en plus évident que des défauts dans la signalisation intracellulaire soient les causes principales de la résistance à l'insuline dans les tissus cibles (Meshkani & Adeli 2009, Leclerq et al 2007). Un premier mécanisme peut impliquer une expression diminuée ou une dégradation augmentée des composantes essentielles pour la signalisation de l'insuline (Leclerq et al 2007). Au niveau hépatique, c'est l'isoforme du substrat du récepteur de l'insuline IRS-2 qui fonctionne comme un adaptateur pour transférer au niveau intracellulaire le signal du lien de l'insuline avec son récepteur (Pirola et al 2004). Or, les

souris déficientes en IRS-2 montrent en effet une hyperglycémie sévère due à une insulino-résistance hépatique (Araki et al Nature 1994)). Il a été montré que l'activation de diverses voies de transduction du signal peut induire une inhibition de la signalisation de l'insuline (Tanti & Jager 2009). La voie JNK et la phospho-kinase C (PKC) peuvent phosphoryler IRS1-2 au niveau de plusieurs résidus de serine et thréonine, ce qui inhibe la transduction du signal, à l'opposé de la phosphorylation sur un résidu tyrosine induite par le récepteur de l'insuline (Weickert & Pfeiffer 2006). Un autre mécanisme est corrélé à l'induction des facteurs inhibiteurs, tels que les *suppressors of cytokine signalling* (SOCS1-3), qui bloquent la signalisation de l'insuline à travers une compétition avec les protéines IRS pour le récepteur de l'insuline et une induction de la dégradation des IRS par le protéasome (Kile et al 2002). Une augmentation de l'activité des phosphatases peut aussi inhiber la signalisation de l'insuline (Schinner et al 2005). Des études *in vivo* ont montré que chez la souris, la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTPB1) est un régulateur majeur dans la signalisation de l'insuline (Kaszubska et al 2002).

La stéatose hépatique peut être une cause de l'insulino-résistance, même si dans la NAFLD il semble plus probable que le site primaire de l'insulino-résistance soit périphérique (le muscle) avec la stéatose hépatique qui suit temporellement et l'exacerbe (Kim et al 2001, Tiikkainen et al 2004).

L'insulino-résistance est aussi un facteur prédictif de la présence d'autres pathologies hépatiques plus graves comme la cirrhose, voire le CHC (Figure 4) (Bugianesi 2007).

La présence d'une stéatose est donc désormais considérée comme un marqueur important de l'insulino-résistance multi-organes, indépendamment de l'indice de masse corporel (IMC), indice mesurant le poids et la taille, ou la masse grasse viscérale (Korenblat et al 2008, Fabbrini et al 2009 Bugianesi et al 2005a, Seppälä-Lindroos et al 2002). Des études récentes ont montré des liens étiologiques importants qui suggèrent que l'évolution de la NAFLD est étroitement associée à une augmentation du risque d'apparition d'un CHC (Starley et al 2010). L'obésité a été définitivement définie comme un facteur de risque de développer un cancer primitif du foie, soit un risque de 1,5 à 4 fois (Moller et al 1994, Wolk et al 2001, Calle et al 2003, Oh et al 2005). Le diabète est aussi un facteur indépendant qui augmente de 1,8 à 4 fois le risque de CHC, comme le démontrent des études de cohortes conduites en Suède, Danemark et Grèce (Adami et al 1996, Wideroff et al 1997, Lagiou et al 2000).

Il est donc évident qu'il existe une intégration systémique qui lie l'altération de la signalisation de l'insuline et le développement d'une inflammation chronique. Cette situation pourrait être à la base de l'établissement des mécanismes adaptatifs aux lésions tissulaires, cellulaires et subcellulaires qui permettent une survie cellulaire au cours de la progression de la NAFLD. C'est pourquoi, il apparaît nécessaire d'adopter une vision d'ensemble des mécanismes impliqués dans la

NASH pour lutter contre les causes de cette pathologie et en limiter son impact sur la santé publique.

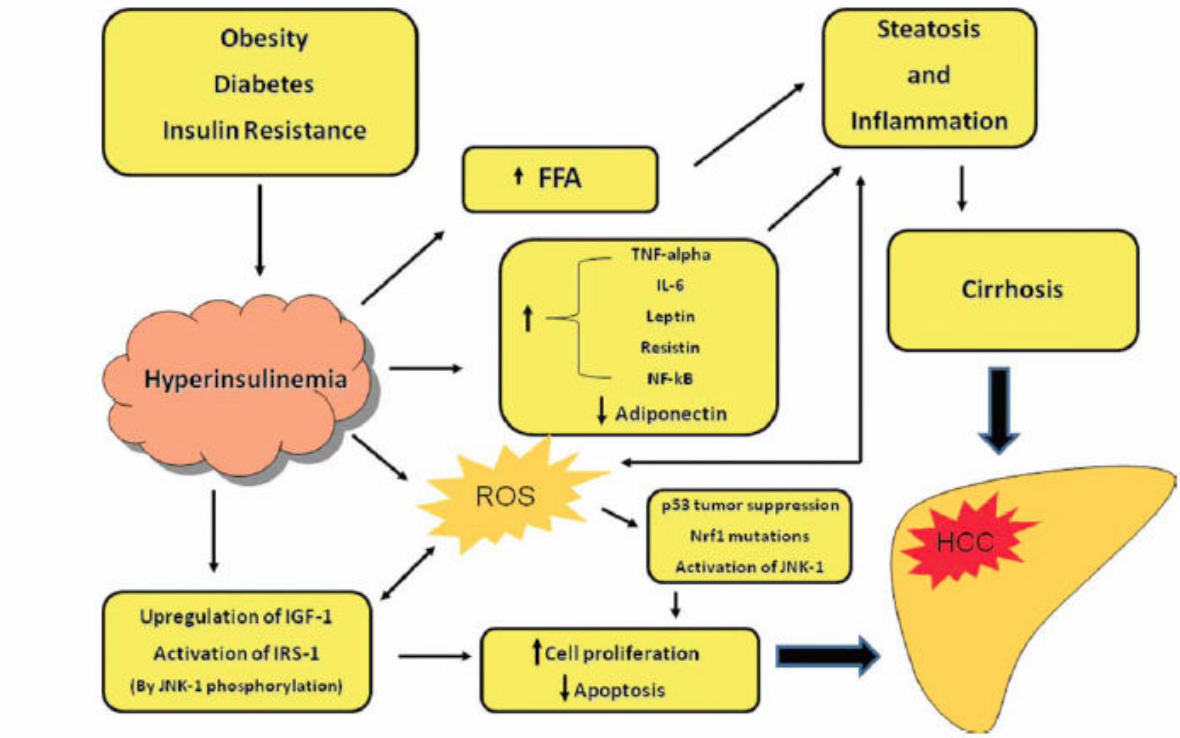


Figure 4. Modèle de pathogenèse du carcinome hépatocellulaire dans la non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). L'hyperinsulinémie augmente la concentration en taux d'acides gras libres, la production de cytokines inflammatoires, la signalisation prolifération et les espèces réactives de l'oxygène, facteurs qui peuvent agir en synergie augmentant le risque de développement d'un carcinome hépatocellulaire (HCC) (Adapté par Starley et al 2010).

III. Mécanismes de tolérance à la mort cellulaire en réponse à un stress chronique pour le maintien de l'homéostasie

Au cours des dernières années, les études sur les rôles respectifs des lipides autres que les triglycérides et du réticulum endoplasmique (RE) dans l'homéostasie cellulaire ont ouvert de nouvelles pistes de recherche et introduit des nouveaux concepts pour la compréhension des pathologies liées au syndrome métabolique. Ils ont ouvert la voie à une nouvelle notion, dans ce type de pathologie, qui est la mise en place de mécanismes de survie cellulaire en réponse aux stress chroniques, que nous décrirons ici.

Nous discuterons en particulier de la lipotolérance en parallèle de la lipotoxicité, de la réponse au stress du RE, de la nécrose programmée et de l'autophagie dans la physiopathologie de la NAFLD.

III.1 La lipotolérance et la lipotoxicité

La lipotolérance ainsi que la lipotoxicité hépatique due à des métabolites des acides gras et au cholesterol libre sont deux concepts émergents dans la pathogenèse de la NASH (Neuschwander-Tetri 2010). Le terme « lipotoxicité » a été forgé en 1994 par Unger pour décrire les effets toxiques des acides gras sur la survie des cellules β du pancréas (Lee et al 1994). Bien que l'accumulation intracellulaire des lipides sous forme de vésicules constituées par les triglycérides (TG) soit considérée comme la première étape du développement d'une NASH, des données récentes montrent que la formation de gouttelettes lipidiques au niveau hépatocytaire peut représenter une réponse protectrice pour limiter les effets toxiques des acides gras libres (Choi & Diehl 2008). Il faut pourtant garder à l'esprit que l'accumulation des TG n'est probablement pas complètement bénigne : les TG peuvent altérer le flux sanguin hépatique par compression des sinusoïdes au cours de la nécrose hépatocytaire (Wanless & Shiota 2004) et l'accumulation de vésicules lipidiques a été associée à une augmentation des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique, qui peut induire une mort cellulaire par apoptose (Puri et al 2008).

Selon ce modèle pathogène de NASH, des métabolites lipotoxiques des acides gras sont générés en parallèle de la formation des gouttelettes de triglycérides, donnant lieu au phénotype reconnu de NASH, dans lequel la stéatose et les lésions cellulaires co-existent (Figure 5). L'accumulation de triglycérides pouvant être protectrice, elle ne serait plus considérée comme nécessaire pour le développement de la NASH (Neuschwander-Tetri 2010). Les anomalies métaboliques prédisposant aux lésions lipotoxiques comprennent une augmentation du stockage ou une élimination défectueuse des acides gras. L'insulino-résistance joue un rôle central dans ces processus, en

augmentant la lipolyse au niveau du tissu adipeux et en diminuant la consommation de glucose au niveau des tissus périphériques.

Les mécanismes toxiques peuvent comprendre une augmentation de l'oxydation des acides gras et du stress oxydant, une altération de la composition en acides gras et phospholipides des membranes cellulaires, une altération du contenu cellulaire de cholestérol, une perturbation de la signalisation des céramides, ou même une toxicité directe des acides gras libres (Malhi & Gores 2008).

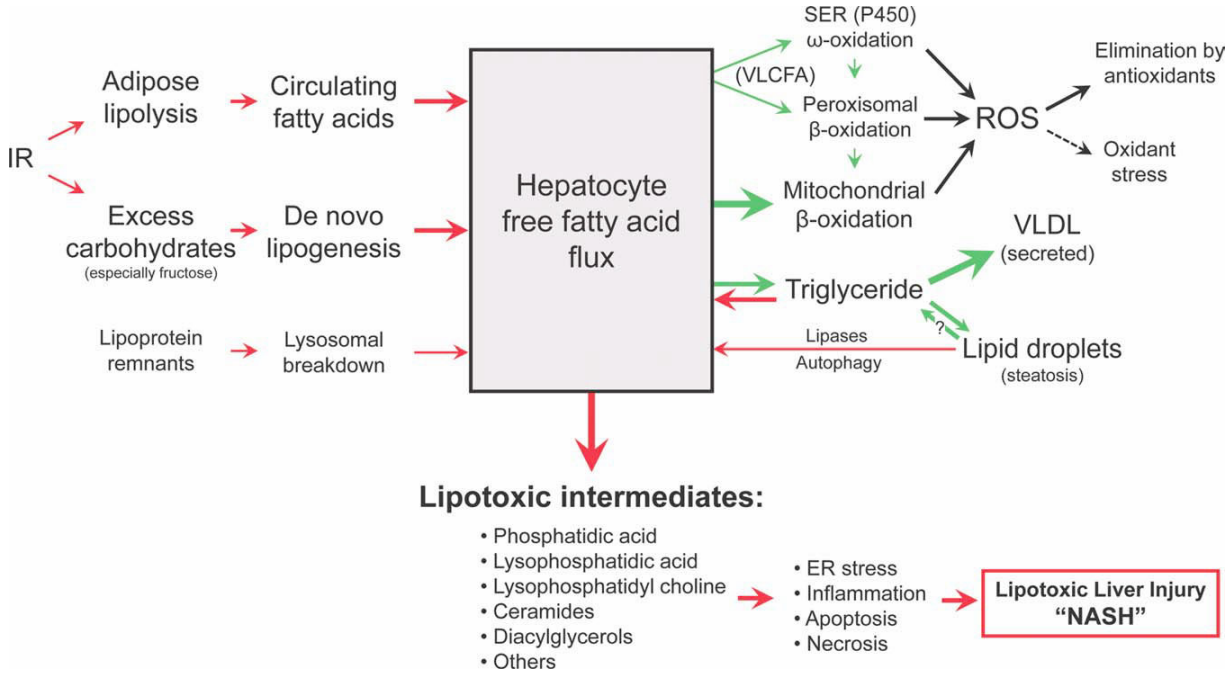


Figure 5. Le modèle de lipotoxicité/lipotolérance de la NASH. Les flèches rouges identifient les processus qui augmentent le stockage d'acides gras au niveau du foie causant les lésions lipotoxiques, les flèches vertes identifient les processus qui éliminent les acides gras réduisant les lésions lipotoxiques. (Neuschwander-Tetri 2010).

La composition lipidique des foies des patients avec NASH ou NAFLD a été récemment caractérisée par Puri et al (2007). Comme attendu, la quantité totale de lipides et triglycérides était plus élevée dans ces 2 groupes de patients par rapport aux groupes contrôles du même âge, sexe et indice de masse corporelle. De façon intéressante, la quantité des acides gras libres n'était pas constamment élevée et elle ne variait pas significativement entre patients atteints de NASH ou de NAFLD. Il a été observé une augmentation du ratio triglycérides/diglycérides en fonction de la progression de la pathologie. La concentration du cholestérol libre était significativement augmentée dans les foies avec NASH, tandis que la phosphatidylcholine était diminuée tant dans les foies avec NAFLD que dans les foies avec NASH. Enfin dans les foies avec NASH, il a été observé

une diminution globale de l'acide arachidonique (20:4n-6) et une diminution de l'acide eicosapentanoique (20:5n-3) et docosahexanoique (22:6n-3) dans les TG, avec un ratio d'acides gras libres n-6/n-3 augmenté dans la NASH. (Puri et al 2007).

Une accumulation intracellulaire excessive d'acides gras libres peut entraîner l'activation de la voie de mort programmée apoptotique (lipo-apoptose) (Figure 6). Les acides gras saturés, comme l'acide palmitique ou stéarique, induisent l'apoptose dans différents types cellulaires, tels que les cellules β du pancréas, le cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les hépatocytes (Shimabukuro et al 1998, Kong & Rabkin 2000, Chai & Liu 2007, Malhi et al 2006), tandis que les acides gras mono-insaturés, comme l'acide oléique et palmitoléique, l'induisent très faiblement (Malhi et al 2006). La présence d'apoptose a été observée dans des biopsies hépatiques de patients atteints de NASH où elle était corrélée à l'activité inflammatoire et au degré de fibrose (Feldstein et al 2003). Il est intéressant de noter qu'une étude sérologique pour la mesure d'un marqueur épithélial d'apoptose, le fragment de la cytokeratine 18, a montré que ce test permettait de distinguer les patients atteints de NASH des patients présentant une stéatose simple et des patients contrôles (Wieckowska et al 2006). Les mécanismes par lesquels les acides gras saturés induisent la lipo-apoptose dans les hépatocytes convergent vers l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax qui entraîne la perméabilisation mitochondriale, la libération du cytochrome c et l'activation des caspases 3 et 7 (Malhi et al 2006). Dans ce modèle, l'activation de Bax est dépendante de la kinase C-Jun N terminale (JNK), qui est activée par les acides gras libres en fonction de leur degré de toxicité, et de la protéine pro-apoptotique Bim, induite par le facteur de transcription FoxO3, dont l'activation est promue par les acides palmitique et stéarique.

Les acides gras libres peuvent accroître la sensibilité des hépatocytes à la voie extrinsèque de l'apoptose induite par les récepteurs de mort, tels que Fas et TRAIL receptor 5, notamment en augmentant leur expression (Feldestein et al 2003, Mahli et al 2007). Il a d'ailleurs été montré que les acides gras libres peuvent activer la voie lysosomiale de l'apoptose (Feldstein et al 2004). La libération de la protéase lysosomiale Cathepsine B peut en effet induire la perméabilisation mitochondriale par clivage de Bax et l'activation de caspases (Guicciardi et al 2004). Chez les patients atteints de NASH, la perméabilisation lysosomiale est associée au degré d'activité inflammatoire (Malhi et al 2008). De plus, l'acide gras saturé palmitate peut induire directement une perméabilisation des mitochondries et augmenter la production des ERO (Malhi et al 2006).

Récemment il a été montré que certains sphingolipides, en particulier les céramides, classiquement considérés comme ayant exclusivement des fonctions structurales dans les membranes biologiques, sont aussi impliqués dans la signalisation du stress cellulaire et dans la voie extrinsèque de l'apoptose (Marì & Fernandez-Checa 2007). La synthèse des céramides dépend

de la disponibilité d'acides gras saturés à longue chaîne, condition existant dans l'obésité (Alkhouri et al 2009). Les céramides jouent d'ailleurs un rôle aussi dans l'insulino-résistance, car ils inhibent l'absorption de glucose, la translocation du transporteur du glucose GLUT4 et la synthèse de glycogène (Summers 2006). Cependant, le rôle des céramides dans la pathogenèse de la NAFLD reste encore à élucider car si le métabolisme des céramides est associé au contenu des lipides hépatiques chez des patients atteints de NAFLD (Greco et al 2008), les études expérimentales n'ont pas confirmé leur implication dans l'apoptose des hépatocytes (Wei et al 2006).

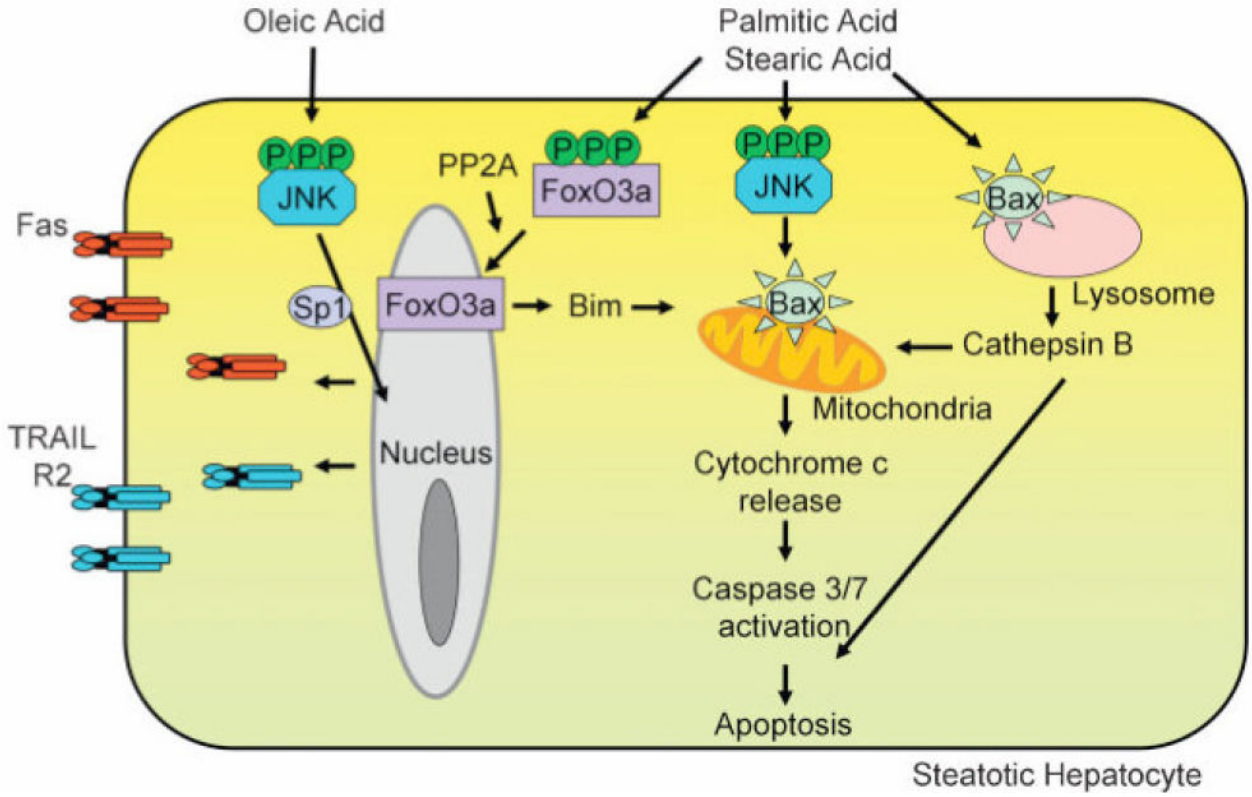


Figure 6. Les acides gras libres (FFA) peuvent induire l'apoptose des hépatocytes. Les FFA peuvent activer la voie extrinsèque soit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les hépatocytes. Les FA saturés, tels que le palmitate et le stéarate, activent la protéine proapoptotique Bax via c-jun N-terminal kinase (JNK) ce qui emmène à la perméabilisation mitochondriale et à l'activation de la cascade apoptotique. L'activation de Bax peut aussi induire la voie lysosomiale de l'apoptose, via une perméabilisation des lysososome. D'ailleurs, le palmitate et le stéarate activent aussi la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui active FoxO3a, et enfin la transcription de la protéine proapoptotique Bim. L'acide gras monoinsaturé oléate n'est pas toxique en lui-même, mais induit l'expression des récepteurs de mort, tels que Fas et TRAIL-R2, ce qui augmente la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose induite par Fas-L et TRAIL (adapté par Mahli et al 2008).

Des données récentes montrent que le cholestérol libre peut augmenter la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose induite par TNFα et Fas, à travers un mécanisme qui implique une déplétion en glutathion mitochondriale (Mari et al 2006). De plus, une étude a rapporté une augmentation de l'expression d'enzymes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (SREBP-2, essentiel pour la synthèse du cholestérol ; et StAR, un transporteur qui permet l'entrée du

cholestérol libre dans la mitochondrie) chez des patients atteints de NASH par rapport à ceux qui ne présentaient que de la stéatose (Caballero et al 2009).

Des résultats récents ont montré une connexion entre le stress du réticulum endoplasmique (RE), dont le rôle dans le développement de la NAFLD sera examiné dans le prochain chapitre, et l'accumulation des lipides. Il a été montré que les acides gras saturés, tels que le palmitate et le stéarate, induisent un stress du RE suivi d'une mort apoptotique impliquant la voie mitochondriale dans des lignées d'hépatome de rat (Wang et al 2006). De façon très intéressante, ces changements ne se produisent pas si les cellules sont traitées par des acides gras mono-insaturés, comme l'oléate et le linoléate. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vivo* utilisant des modèles de NAFLD induits par différents régimes : un régime riche en graisses saturées ou en sucrose entraîne une augmentation du stress du RE, une activation de la caspase 3 et plus de lésions hépatiques par rapport à un régime riche en acides gras poly-insaturés (Wang et al 2006). D'ailleurs, un dérèglement de la réponse au stress du RE est présent dans des biopsies hépatiques de patients avec stéatose ou NASH, par rapport aux sujets ayant un syndrome métabolique mais avec une histologie de foie normal (Puri et al 2008).

L'ensemble de ces résultats montre que l'accumulation des lipides, et en particulier certains lipides, semble jouer un rôle central non seulement dans l'altération de la sensibilité du foie à l'insuline et le développement de la NAFLD, mais aussi dans le mort cellulaire, l'inflammation et la fibrose hépatique. Les nouvelles pistes de recherche devront éclaircir les rôles de ces lipides et leurs interactions pour améliorer les stratégies thérapeutiques et la prise en charge des patients atteints par le large spectre des altérations pathologiques de la NAFLD (Alkhouri et al 2009).

III.2 Le stress du réticulum endoplasmique : un carrefour entre maladie métabolique et inflammation

Le réticulum endoplasmique (RE), organelle responsable du *folding* (repliement), de la maturation et du contrôle qualité des protéines cellulaires, est un des acteurs émergents dans la compréhension des bases pathogéniques des maladies métaboliques (Hotamisligil 2010).

Tous les évènements qui perturbent la capacité de repliement au niveau du RE, comme un excès de synthèse protéique, une altération de la disponibilité énergétique ou un changement du potentiel d'oxydoréduction de son lumen, induisent une réponse physiologique nommée UPR (Unfolded Protein Response) (Kammoun et al 2009, Hotamisligil 2010). L'activation de la voie UPR vise à une augmentation de la capacité de repliement du RE *via* une induction de la transcription de protéines chaperonnes localisées dans le RE et à une diminution générale du stress *via* une inhibition globale de la synthèse protéique (Schroeder & Kaufman 2005) ; (Figure 7).

La voie UPR est modulée par trois protéines de membrane du RE : PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), ATF6 (activation transcription factor-6) et IRE1 (inositol requiring enzyme-1) (Ron & Walter 2007).

Lors d'un stress du RE, la protéine chaperonne BiP/GRP78, la plus abondante du RE, se dissocie de ces trois protéines, aboutissant à leur activation. Une fois activé, PERK phosphoryle et inhibe eIF2α, un facteur qui active la traduction de protéines, entraînant une diminution globale de la synthèse protéique (Harding et al 2000, Ozcan et al 2004). ATF6 est un facteur de transcription qui, dissocié de GRP78 est ensuite clivé dans sa forme mature dans le Golgi. ATF6 clivé migre dans le noyau où il induit la transcription des chaperonnes du RE. Enfin, IRE1 possède une activité endonucléase qui permet l'épissage alternatif du transcrit codant le facteur de transcription XBP1, ce qui permet sa traduction. Les gènes cibles de XBP1 sont des chaperonnes du RE et des protéines impliquées dans la dégradation des protéines mal repliées (Kammoun et al 2009).

Si l'homéostasie du RE n'est pas assurée, la cellule meurt par apoptose. L'apoptose induite par le stress du RE peut être dépendante ou indépendante des caspases, mais une interaction étroite entre RE et mitochondrie semble nécessaire pour aboutir à la mort programmée (Kroemer et al 2007). Bax et Bak, deux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui forment des pores au niveau de la membrane mitochondriale induisant sa perméabilisation, sont impliquées aussi dans la libération du Ca^{2+} du RE, un point de contrôle de l'apoptose (Scorrano et al 2003).

La libération du Ca^{2+} du RE active des protéases cytosoliques ou ancrées au RE, les calpaïnes, qui favorisent la translocation de Bax et ensuite la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Kim et al 2008). Par ailleurs, l'inhibition des calpaïnes est plus efficace que l'inhibition des caspases pour bloquer l'apoptose induite par un stress du RE (Sanges & Marigo 2006). Enfin, de nouvelles protéines du RE ayant une forte homologie avec ATF6α ont été récemment identifiées. Ceci suggère que le modèle traditionnel de l'UPR à trois voies est peut-être encore partiel (Bailey & O'Hare 2007).

Pour comprendre le rôle du RE dans le métabolisme systémique, selon Hotamisligil (2010), il est nécessaire de considérer que : 1) les conséquences physiologiques d'une dysfonction du RE ne peuvent être expliquées seulement par des réponses d'un système cellulaire qui vise à maintenir un repliement correct des protéines et à surmonter un stress ; 2) le RE peut être vu comme un système senseur du niveau énergétique et de nutriments qui intègre au niveau cellulaire les réponses métaboliques et qui établit des relations fonctionnelles avec les réseaux endocrines systémiques (Figure 8); 3) les cellules aux capacités sécrétoires ou métaboliques élevées ne doivent pas forcement faire face à des stress similaires, donc leurs stratégies pour maintenir l'homéostasie du RE ou activer l'UPR peuvent être différentes.

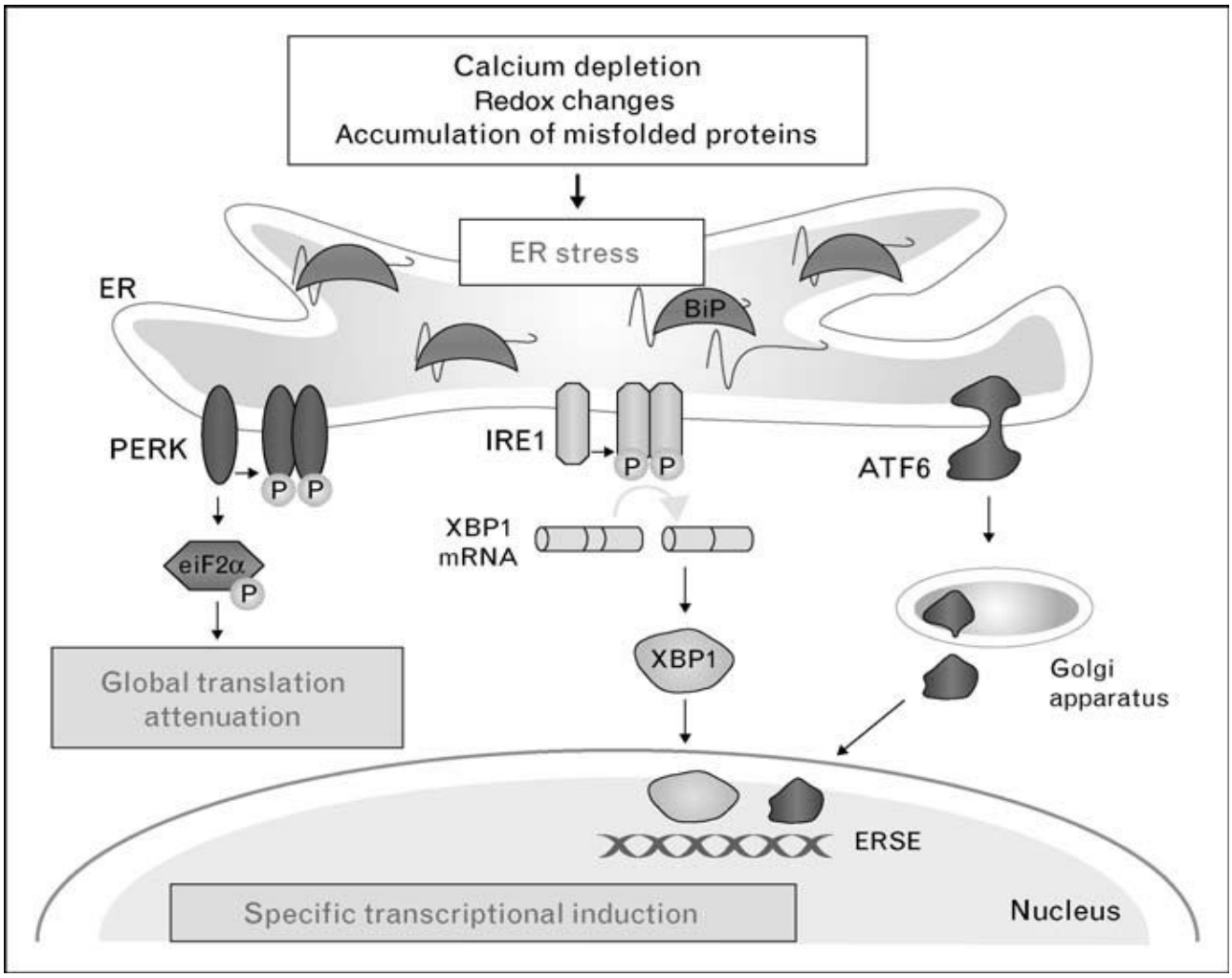


Figure 7. Réponse UPR aux stress du réticulum endoplasmique (RE). La réponse UPR est induite lors d'une perturbation de l'homéostasie du RE, par accumulation de protéines mal repliées, changement du potentiel redox ou des concentrations de calcium. La première étape est la dissociation de la protéine chaperonne BiP des trois protéines du RE, PERK, ATF6 et IRE1, ce qui permet leur activation. PERK phosphoryle et inhibe le facteur de traduction eiF2α menant à un ralentissement globale de la synthèse protéique. ATF6 est soumis à un clivage protéolytique dans le Golgi, et sa forme mature migre au noyau et induit la transcription des gènes présentant un promoteur avec le ER Stress Response Element (ERSE), le plus connu étant le gène pour XBP1. Enfin, l'activité endoribonucléase de IRE1 permet un épissage fonctionnel de l'ARNm de XBP1. La protéine XBP1 est un facteur de transcription qui induit la transcription de gènes codant pour des chaperonnes et de protéines des complexes de degradation. Adapté par Kammoun et al 2009.

Par exemple, un plasmocyte qui secrète des anticorps ou une cellule β du pancréas qui produit l'insuline doivent adapter la capacité de leur RE à une demande fluctuante de synthèse et sécrétion (Ron & Walter 2007). D'ailleurs, des cellules métaboliquement actives comme les hépatocytes ou les adipocytes doivent faire face à des challenges encore plus importants concernant l'homéostasie du RE. Les adipocytes ne stockent pas seulement des quantités énormes de lipides, mais produisent et secrètent aussi de nombreuses protéines (adipokines, par exemple), lipides et médiateurs lipidiques dans des conditions structurales très particulières et uniques (Rosen & Spiegelman 2006,

Gregor & Hotamisligil 2007). Les hépatocytes secrètent constitutivement une grande quantité de protéines et des complexes lipoprotéiques qui demandent des capacités de synthèse extrêmement spécifiques en fonction du type de lipides (Hotamisligil 2010).

En ce qui concerne les relations entre le stress du RE et les maladies métaboliques, de nombreuses études ont montré que la voie UPR joue en rôle important dans l'obésité, le diabète, ainsi que dans la stéatose hépatique (Ozcan et al 2004, Scheuner et al 2001, Boden et al 2008, Gregor et al 2009). Dans le tissu adipeux de sujets obèses et insulino-résistants, il a été montré une expression augmentée des médiateurs de la voie UPR (Boden et al 2008). Parallèlement, une diminution du poids induite par une chirurgie bariatrique réduit le stress du RE chez des patients obèses (Gregor et al 2009).

L'obésité induit un stress du RE dans le foie et ensuite une insulino-résistance due à la phosphorylation de *l'insulin receptor substrate 1* (IRS-1) à travers l'activation del' IRE1α et JNK (Ozcan et al 2004). D'ailleurs, le stress du RE active directement le facteur de transcription lipogénique SREBP-1c, induisant la voie de la lipogenèse indépendamment de l'action de l'insuline (Ye et al 2000). Dans les hépatocytes, XBP1 (effecteur aval de IRE1α) contrôle l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (Hotamisligil 2010) et PERK joue un rôle important dans la lipogenèse hépatique en régulant les facteurs de transcription lipogénique C-EBP et PPARγ (Lee & Glimcher 2009).

L'activation de la voie UPR est également associée à une diminution de la sécrétion des protéines VLDL (Hummasti & Hotamisligil 2010). Inversement aux autres marqueurs du stress du RE, ATF6α est diminué dans le foie de souris obèses et sa restitution via une ATF6α adénovirale améliore l'homéostasie du glucose chez les mêmes animaux (Wang et al 2009). Ceci suggère que la production de chaperonnes en réponse aux exigences du repliement de protéines est dissociée d'autres voies de signalisation, médiées par l'UPR, qui concernent les effets métaboliques nocifs de l'obésité (Hummasti & Hotamisligil 2010). Il a été montré que l'utilisation des chaperonnes chimiques telles que l'acide phénylbutyrique (4-PBA) et l'acide tauroursodeoxycholique (TUDCA) est efficace dans le traitement de la stéatose hépatique, en déterminant une résolution du stress RE, la disparition de la stéatose, une normalisation de la glycémie et de la sensibilité à l'insuline chez des souris *ob/ob* (Ozcan et al 2006, Ozcan et al 2009)

Enfin, une perturbation de l'autophagie a été décrite dans les dysfonctions métaboliques (Yang et al 2010, Ebato et al 2008). Une réduction de la protéine Atg7, essentielle à l'autophagie, comme il sera décrit dans le chapitre suivant, diminue la sensibilité à l'insuline dans les foies des souris et augmente le stress du RE. D'ailleurs, son expression est diminuée dans les foies des souris obèses et sa reconstitution diminue à la fois le stress du RE et la réponse à l'insuline (Yang et al 2010).

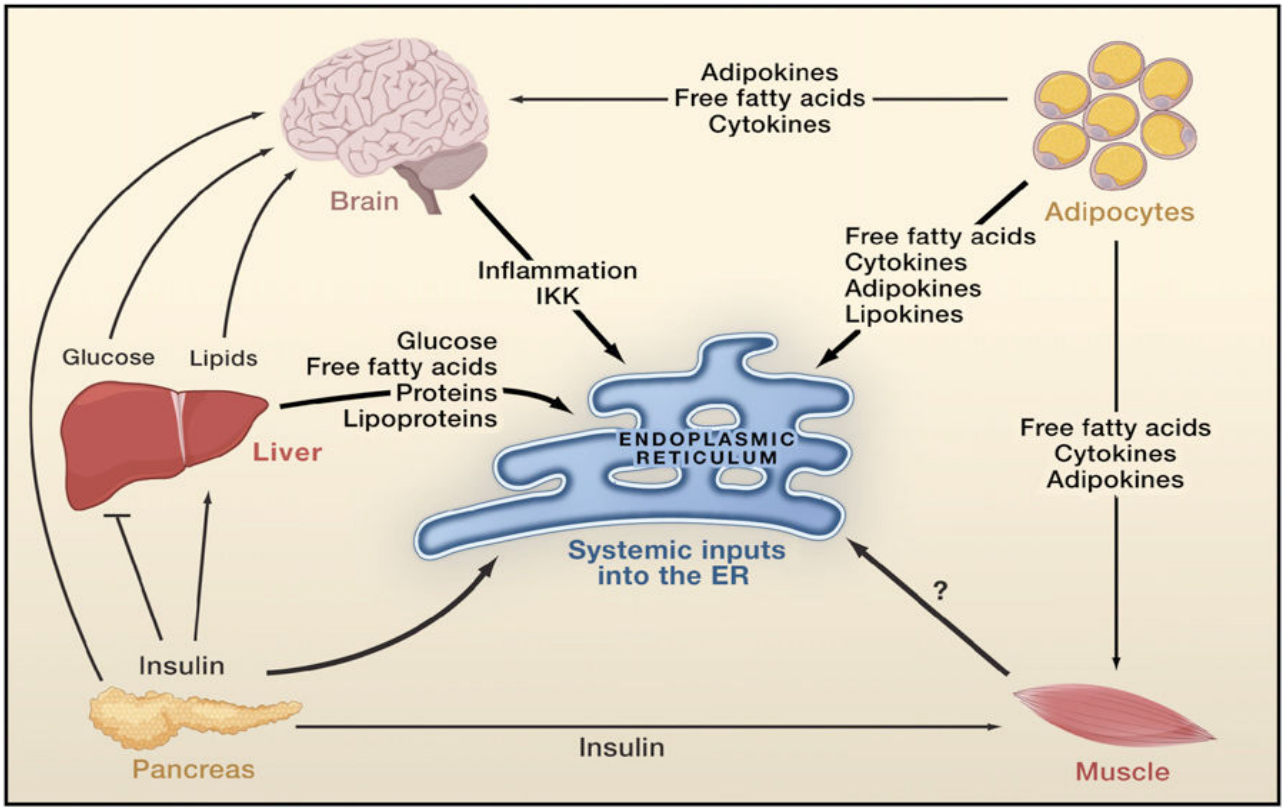


Figure 8. Interactions entre les organes dans la régulation métabolique. Le glucose provenant de l'alimentation ou des sources endogène stimule la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas. L'insuline diminue la production hépatique du glucose, inhibe la lipolyse et augmente l'absorption du glucose par le muscle et le tissu adipeux. Les adipocytes, avec un mécanisme de contre-régulation négative, libèrent des acides gras qui augmentent la gluconéogenèse et la lipogenèse dans le foie, diminuent l'absorption de glucose dans le muscle ainsi que la sécrétion d'insuline du pancréas. De plus, les adipocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNFα, ou des adipokines, telles que l'adiponectine qui régule la consommation d'aliments, le dépense énergétique et la sensibilité à l'insuline, soit directement soit via le cerveau. Le cerveau contrôle les signaux métaboliques (concentration sérique du glucose et des acides gras libres) et hormonaux (insuline, leptine), en régulant le métabolisme global de l'organisme. Dans ce contexte, le réticulum endoplasmique (RE) fonctionne comme un senseur des nutriments. En effet, dans les adipocytes un excès de stockage de lipides, la lipogenèse et la synthèse d'adipokines peut induire un stress du RE. Dans le foie, le transport de lipides, la lipogenèse, une synthèse excessive de protéines et la gluconéogenèse influencent les fonctions du RE. Une demande excessive d'insuline peut mener à un stress du RE dans les cellules β du pancréas. Enfin, un niveau trop élevé d'acides gras libres circulants et de cytokines peut induire un stress du RE dans l'hypothalamus à travers l'activation de la IkB kinase (IKK). Adapté par Hotamisligil 2010.

L'ensemble de ces résultats montre que les traitements et la modulation des voies de signalisation qui visent à rétablir l'homéostasie du RE semblent jouer un rôle protecteur dans un contexte de maladie métabolique et de NAFLD.

Des études récentes montrent une implication du stress du RE dans le contrôle de la mort cellulaire au cours des lésions d'ischémie/réperfusion (I/R). En effet, l'I/R altère la capacité du RE à synthétiser, replier et adresser les protéines, induisant un stress du RE (Orrenius et al 2003, Breckenridge et al 2003). Les mécanismes sous-jacents au stress du RE induit par l'I/R peuvent être

liés tant à l'hypoxie et l'hypoglycémie qui causent un repliement non correct des protéines qu'à la chute des concentrations en ATP qui suit l'I/R. En effet, la voie UPR pourrait représenter une réponse métabolique à cette chute, car elle diminue la consommation globale d'ATP (Pallet et al 2009, Uehara et al 2007). Par ailleurs, lors de la reperfusion, on observe le déclenchement d'un stress oxydant avec la production de ROS et de NO qui interfèrent avec les réactions dépendantes du potentiel redox et la production des ponts disulfure, entraînant un mauvais repliement des protéines (Orrenius et al 2003, Breckenridge et al 2003, Uehara et al 2007). Ces mécanismes semblent être communs à tous les organes, car une activation de l'UPR est retrouvée dans le cerveau, le cœur, le rein aussi bien que dans le foie lors qu'ils subissent une I/R (Pallet et al 2009, Mosbah et al 2010). De façon intéressante, une étude récente a montré une activation différente des trois branches de la voie UPR dans des foies stéatosiques par rapport aux foies normaux soumis à une I/R dans un modèle expérimental d'hépatectomie partielle (Mosbah et al 2010). En particulier, les foies stéatosiques présentent une activation plus faible de IRE1α et de PERK qui, par conséquent, réduit la présence des facteurs pro-apoptotiques liés au stress du RE, tels que les caspases 9 et 12, CHOP et JNK, par rapport aux foies non stéatosiques. Ces résultats contribuent à la compréhension d'un concept plusieurs fois rapporté sur une meilleure tolérance des foies stéatosiques à l'apoptose (Clavien et al, 2000, Selzner et al 2000). Les résultats obtenus par Mosbah et al (Mosbah et al 2010) montrent cependant que les lésions mitochondriales et du RE observées à la suite de l'I/R sont plus sévères dans les foies stéatosiques. Le traitement avec la chaperonne chimique TUDCA est globalement plus efficace que le traitement par 4-PBA en diminuant les concentrations sériques de AST et ALT dans les foies stéatosiques plus que dans les foies non stéatosiques. Cela semble être corrélé au fait que le TUDCA diminue significativement les lésions mitochondriales et du RE, tandis que le traitement avec 4-PBA se montre efficace seulement au niveau du RE (Mosbah et al 2011). Globalement ces résultats suggèrent que le stress du RE peut être à la fois un marqueur de toxicité et de tolérance à la mort cellulaire et que la mort cellulaire induite par la mitochondrie et par le RE sont étroitement liées dans l'I/R hépatique et qu'il est nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques qui envisagent la prise en charge des plusieurs mécanismes d'actions impliqués, en fonction aussi de la pathologie hépatique sous-jacente et du type d'ischémie (chaude dans le cas d'hépatectomie partielle et froide dans le cas de transplantation hépatique) (Peralta & Brenner in press).

Il est intéressant de noter que les altérations décrites dans ce chapitre sont toutes impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire et qu'elles sont strictement liées au contrôle de la balance énergétique et à la réponse inflammatoire. Or, l'intégration des processus inflammatoires, de la

signalisation hormonale et énergétique a été proposée comme un aspect critique pour la compréhension de l'étiologie des cancers (Slattery & Fitzpatrick 2009).

III.3 La nécrose : une mort cellulaire régulée

Les mécanismes de contrôle de la mort cellulaire sont à la base du maintien de l'homéostasie cellulaire, qui est essentielle pour assurer l'intégrité des tissus chez les organismes multicellulaires.

Différents types de mort cellulaire ont été décrits au cours d'une conférence de consensus, comprenant l'apoptose, la nécrose, la nécroptose, l'autophagie et la kératinisation (qui est pourtant réstreinte aux couches superficielles de l'épiderme et à certaines modifications pathologiques des muqueuses) (Figure 9) (Galluzzi et al 2009).

La nécrose (du grec «cadavre») est définie par la détection en microscopie optique ou électronique de renflements des cellules et organelles, de noyaux pycnotiques et d'une rupture de la membrane plasmique avec libération des constituants intracellulaires dans le milieu extracellulaire. Ceci est à l'origine d'un processus inflammatoire, favorisé par une phagocytose incomplète de la cellule nécrotique, et rend possible la détection plasmatique de marqueurs de nécrose (Hotchkiss et al 2009). La nécrose est causée habituellement par une défaillance métabolique qui mène à une déplétion rapide d'ATP, comme dans le cas de l'ischémie ou de lésions diffuses à l'ADN (Leist et al 1997, Malhi et al 2006). La compromission des membranes des organelles permet aux enzymes protéolytiques d'envahir le cytosol, causant la destruction de la cellule (Zong & Thompson 2006, Conus & Simon 2008).

La nécrose est considérée comme un processus largement accidentel qui survient lors d'une hypoxie aigue ou d'une lésion d'ischémie/reperfusion, comme dans l'infarctus du myocarde ou dans les accidents vasculaires cérébraux. Dans les tumeurs, la nécrose survient spontanément lorsque la prolifération cellulaire dépasse l'angiogenèse (Hotchkiss et al 2009).

Au niveau moléculaire, la dépletion en ATP entraîne la diminution de l'activité des calcium ATPases responsables de l'efflux de calcium hors de la cellule, ce qui augmente la concentration en calcium intracellulaire et, par consequent, intra-mitochondrial. Ceci diminue le potentiel membranaire mitochondrial avec rétro-activation de la chaîne respiratoire et augmentation de la synthèse d'ERO. Dans le cas d'altération de l'ADN, la mort nécrotique est initiée par PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) (Conus & Simon 2008). PARP est une enzyme réparatrice de l'ADN qui, dans les cas d'endommagements multiples à l'ADN, peut épuiser les réserves d'ATP, un facteur responsable de la commutation de l'apoptose à la nécrose. En effet, au cours de l'apoptose, PARP est inactivée par clivage, ce qui permet la préservation de l'ATP (Los et al 2002, Jagtap & Szabo 2005).

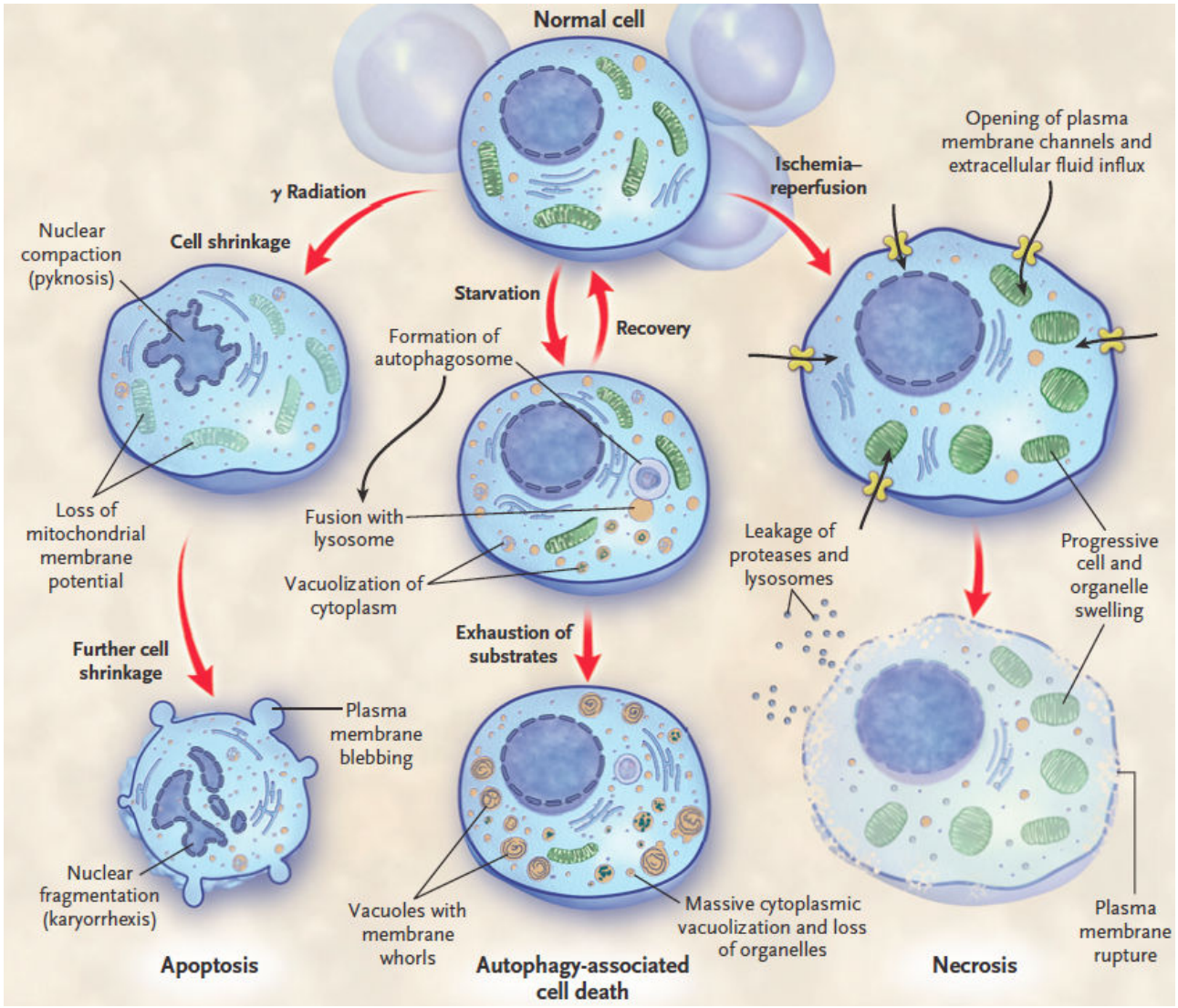


Figure 9. Trois voies de mort cellulaire. Parmi les trois voies principales de mort, l'apoptose, l'autophagie et la nécrose, un des trois peut prévaloir en fonction des lésions et du type cellulaire. Il existe une interconnexion entre les différentes voies de mort à plusieurs niveaux qui ne sont pas détaillés dans la figure. Adapté par Hotchkiss 2009.

L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium active des protéases qui dégradent les constituants cytoplasmiques. Cependant, la source et la quantité de cette augmentation peuvent induire deux types différents de mort cellulaire : si l'influx des ions provient de l'extérieur de la cellule à travers la membrane plasmique, ce sera la nécrose qui sera déclenchée ; par contre, si le calcium provient du réticulum endoplasmique, ce sera l'apoptose qui sera plutôt induite (Zong & Thompson 2006, Vanlangenakker et al 2008)

Des évidences récentes montrent que la nécrose n'est pas un processus totalement accidentel. Elle semble finement régulée par des voies de signalisation et par des mécanismes cataboliques. (Golstein & Kroemer 2007, Festjens et al 2006). En effet, la mort par nécrose et par apoptose présente des similitudes suggérant que la nécrose pourrait être régulée (Proskuryakov et al, 2003). Il a été montré que les récepteurs de mort (TNFR1, Fas, TRAIL-R), typiquement connus pour induire

une mort apoptotique, peuvent aussi induire la nécrose, notamment dans le cas d'inhibition des caspases (Galluzzi et al 2009). Des cascades biochimiques et moléculaires stéréotypées ont été mises en évidence (Golstein & Kroemer 2007) et la relation entre calcium, déplétion en ATP et ERO pourrait être un processus programmé. C'est le cas, d'une dysfonction mitochondriale avec diminution d'ATP et production accrue d'ERO, d'une perte de l'homéostasie calcique, d'une activation des calpaïnes avec démantèlement nucléaire et enfin d'un gonflement de la cellule et des organites aboutissant à la rupture des lysosomes libèrant des cathépsines et à la rupture de la membrane plasmique (Festjens et al, 2006 et Zong & Thompson, 2006).

La voie la mieux étudiée aboutissant à une nécrose programmée est celle du recepteur TNFR1. En fonction du type cellulaire et du microenvironnement cellulaire, le lien entre TNF et son récepteur peut determiner la survie cellulaire, l'apoptose ou la nécrose programmée, ce qui montre l'existence d'un réseau de signaux qui peut orienter la cellule vers differents types de reponse (Wilson et al 2009). Lors du lien entre TNF et TNFR1, la partie cytosolique du recepteur change de conformation et permet le recrutement de differentes protéines en formant ce qui est appelé *complex I*. Parmi ces protéines adaptatrices qui forment le complexe, la kinase RIP1 semble jouer en rôle central dans la régulation de la réponse. En fonction du type cellulaire et du facteur déclenchant la mort, le *complex I* peut induire une réponse cytoprotectrice, via NFκB, ou cytotoxique, via NOX1, une NADPH oxydase qui génère des ERO (Vandenabeele et al 2010). Lors du lien ligand-récepteur, le complexe peut être internalisé, ce qui induit une transition du *complex I* au *complex II*, un complexe qui peut promouvoir l'apoptose ou la nécrose programmée. Le recrutement des kinases RIP1 et RIP 3 influence cette transition (Cho et al 2009). Dans le *complex II*, on retrouve la caspase 8, qui en conditions normales, inactive RIP1 et RIP3 par clivage protéolytique, initiant l'activation de l'apoptose (He et al 2009). En effet, si la caspase 8 est inhibée ou absente, le *complex II* ne peut pas activer l'apoptose et la signalisation de TNFR1 aboutit à la nécrose programmée (Holler et al 2000). Certain auteurs ont proposé de classer cette mort cellulaire dépendant de RIP1 comme *necroptosis* pour permettre la distinction entre une nécrose programmée et les formes accidentelles de nécrose (Galluzzi et al 2009). La *necroptosis* dépend largement de la régulation réciproque entre RIP1 et RIP3 et la littérature récente montre l'existence de voies de signalisation qui connectent les récepteurs de mort aux transducteurs pro-inflammatoires, apoptotiques ou nécrotiques (Vandenabeele et al 2010).

Dans le foie, comme dans les autres organes, la nécrose est une modalité de mort cellulaire liée principalement aux événements aigus, comme les intoxications alimentaires ou médicamenteuses, les infections virales ou les lésions d'ischémie/reperfusion. En ce qui concerne le rôle de la nécrose dans la NAFLD, comme nous l'avons précédemment décrit, la plupart des données disponibles

provient d'études sur les effets de l'ischémie/reperfusion dans des modèles de chirurgie expérimentale ou humaine (Selzner & Clavien 2001, Peralta et al 2001, El-Badry et al 2007). La mort par nécrose a été décrite pour être prépondérante et plus précoce dans les foies stéatosiques à la suite d'une ischémie d'une heure par rapport à des foies non stéatosiques dans lesquels l'apoptose était la principale voie de mort (Selzner et al 2000). De façon intéressante, l'apoptose est un événement plus précoce que la nécrose tant dans les foies stéatosiques que dans les foies normaux, ce qui suggère, au moins partiellement, l'implication d'un mécanisme métabolique/énergétique rendant les foies stéatosiques moins capables de finir le programme apoptotique. D'ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs des caspases, malgré leur capacité à diminuer l'apoptose y compris dans les foies stéatosiques, ne diminue pas le déroulement de la nécrose (Selzner et al 2000), laissant supposer l'existence d'une insensibilité à l'apoptose intrinsèque des foies stéatosiques soumis à une ischémie. Une implication des troubles de la microcirculation sinusoïdale a été décrite dans les lésions de reperfusion (El-Badry et al 2007). Les défauts de la microcirculation sont majeurs dans les foies présentant une macrostéatose (ce qui signifie la présence d'une seule vacuole lipidique déplaçant le noyau à la périphérie de la cellule) par rapport aux foies normaux et aux foies présentant une microstéatose (présence de plusieurs microvésicules lipidiques dans le cytoplasme des hépatocyte avec un noyau qui reste placé au centre de la cellule) (El-Badry et al 2007). De façon intéressante et originale, les auteurs montrent que la macrostéatose peut être une évolution de la microstéatose, plutôt qu'une entité distincte, et qu'un déséquilibre de l'apport en acides gras polyinsaturés (oméga-6 et oméga-3) peut jouer un rôle important dans les lésions d'ischémie/reperfusion. En particulier, cela pourrait être expliqué par le fait que, par rapport aux acides gras oméga-6, les acides gras oméga-3 favorisent la transcription de gènes responsables de la β-oxydation mitochondriale et diminuent la transcription de gènes responsables de leur synthèse (Levy et al 2004). De surcroît, les acides gras oméga-3 peuvent diminuer l'activation des cellules du Kupffer, avec un effet anti-inflammatoire bénéfique lors de la reperfusion (Vollmar et al Crit Care Med 2002). Ces résultats confirment une implication des acides gras libres dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, comme nous l'avons décrit auparavant. Récemment, il a été montré que l'accumulation hépatique d'acides gras libres induit une perméabilisation des mitochondries et lysosomes, favorisant la mort cellulaire (Li et al 2008). L'ensemble des données récentes de la littérature scientifique suggère que les voies de mort cellulaire présentent de nombreux carrefours communs de régulation réciproque (Maiuri et al 2007, Vandenabeele et al 2010). Ceux-ci intègrent les signaux provenant des différents types de stress auxquels la cellule peut être soumise et, en fonction de leur durée et intensité ainsi que de l'état métabolique de la cellule, la survie ou une de voie de mort devient privilégiée. Une meilleure connaissance des mécanismes de régulation et de

tolérance à la mort cellulaire pourra permettre l'élaboration des stratégies préventives et thérapeutiques dans différentes conditions pathologiques, telles que les maladies (neuro/hépato) dégénératives, les lésions d'I/R, et le cancer.

III.4 L'autophagie : mécanisme de tolérance à la mort cellulaire dans la NASH

L'autophagie (du grec, autodigestion) est un processus du catabolisme intracellulaire qui est essentiel pour le développement, la différentiation, la survie et l'homéostasie cellulaire envers différents types de stress (Mizushima et al 2008, Kroemer et al 2010). L'autophagie est un phénomène connu depuis des décennies, conservé chez les eucaryotes de la levure aux mammifères. Mais ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que son rôle physiopathologique a été exploré (Levine & Kroemer 2008). Une altération de l'autophagie a été montrée dans les pathologies neurodégénératives, les infections, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Levine & Kroemer 2008).

Lors de l'autophagie, une partie du matériel cytoplasmique, compris des organelles, est adressé vers les lysosomes pour y être dégradé. Il existe trois types différents d'autophagie qui se différentient par leur fonction physiologique et modalité d'adressage aux lysosomes : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Levine & Kroemer 2008, Terman et al 2007). La microautophagie consiste en la séquestration du cytoplasme par invagination directe de la membrane lysosomiale (Marzella et al 1981, Sahu et al 2011) ; la macroautophagie, classiquement appelée autophagie (terme qui sera utilisé ensuite pour la décrire), consiste en la formation hautement régulée de vésicules à double membrane lipidique (autophagosome) qui, après séquestration des macromolécules et organelles, fusionnent avec les lysosomes (autophagolysosome) pour permettre la dégradation du matériel cellulaire (Levine & Klionsky 2004) ; l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes dégrade spécifiquement des protéines cytosoliques contenant un motif KFERQ, directement adressés aux lysosomes (Kaushik et al 2011).

Lors d'un stress non létal tel que les variations physico-chimiques du microenvironnement cellulaire et les signaux extracellulaires comme les hormones, les cytokines ou la présence de pathogènes, la cellule répond en adaptant son métabolisme pour se protéger et survivre. L'autophagie est un processus central dans cette réponse adaptative qui implique différentes voies biochimiques contrôlant l'absorption de nutriments, le métabolisme intermédiaire, le cycle cellulaire et les programmes de survie et mort cellulaire (Kroemer et al 2010).

La carence en nutriment est la condition physiologique la mieux connue pour induire l'autophagie. Dans la plupart des cellules de mammifères cultivées *in vitro* et soumises à une

carence en acides aminés et glucose ou en facteurs de croissance (sérum), on observe le déclenchement d'une autophagie dans les minutes suivantes. (Boya et al 2005). Chez la souris, après 24-48 heures de jeun, la plupart des tissus présente une augmentation du nombre d'autophagosomes (Mizushima et al 2004). Dans ce contexte, l'autophagie est induite par l'AMP activated protein kinase (AMPK), senseur énergétique activé par l'augmentation du ratio intracellulaire AMP/ATP, tandis qu'elle est inhibée par le mammalian target of rapamycin (mTOR), complexe protéique qui intègre les signaux provenant des facteurs de croissance et de la présence de nutriments (Kim et al 2011). L'interaction de ces deux acteurs peut être soit directe, car l'AMPK activée peut inhiber directement mTOR par phosphorylation (Meijer & Codogno 2007), soit indirecte, comme dans le cas de la phosphorylation différentielle de la protéine pro-autophagique Ulk1 (Kim et al 2011). Dans ce dernier cas, en l'absence de glucose, l'AMPK phosphoryle les sérines 317 et 777 activant Ulk1, tandis qu'en présence suffisante de nutriments, mTOR phosphoryle Ulk1 sur la Serine757, ce qui empêche son interaction avec l'AMPK.

Le stress du réticulum endoplasmique (RE), médié par le système de réponse aux protéines non correctement repliées (unfolded protein response, UPR) est également un stimulus important de l'autophagie (Kroemer et al 2010), d'autant plus que le RE est aussi une source capitale pour la formation de la membrane des autophagosomes. Comme il a été précédemment décrit, les voies impliquées dans l'UPR sont contrôlées par trois protéines associées à la membrane du RE : PERK, ATF6 et IRE1 (Hotamisligil 2010). Ces protéines sont normalement maintenues inactives grâce à leur lien avec la protéine chaperonne GRP78. Lors d'une augmentation du nombre de protéines mal repliées, GRP78 est impliquée dans leur repliement, ce qui libère et active PERK, ATF6 et IRE1. En particulier, l'activation de PERK et ATF6 induit l'autophagie, tandis qu'IRE1 activée la supprime (Kroemer et al 2010).

PERK est responsable de l'activation des protéines pro-autophagiques, telles que LC3 et Atg 5, à travers l'action des facteurs de transcription ATF4 et CHOP (Rouschop et al 2010). PERK phosphoryle le facteur de traduction eIF2α sur sa sérine 51. Cette phosphorylation donne lieu à une inhibition générale de la traduction et à une traduction sélective d'ARN messagers de réponse au stress (Hotamisligil 2010). La phosphorylation de eIF2α joue un rôle déterminant, bien qu'encore non élucidé, dans l'induction de l'autophagie. En effet, les cellules ayant une mutation pour une forme non phosphorylable de eIF2α (S51A) ne sont pas capables d'induire l'autophagie en réponse à la carence en nutriments (Kouroku et al 2007). Il est intéresant de noter qu'eIF2α intègre la réponse à différents types de stress environnementaux et endogènes hormis le stress RE, tels que la carence en acides aminés, l'exposition aux UV, l'exposition aux ARN double brins viraux, le stress osmotique, l'hypoxie et le stress oxydant (Harding et al 2003).

IRE1 est une kinase dotée d'une activité endoribonucléase qui catalyse un épissage de la forme codant pour le facteur de transcription XBP1, qui, à son tour, transactive les gènes impliqués dans l'UPR, comme l'*ER-associated degradation*, le contrôle de la qualité et le repliement des protéines (Hetz & Glimcher 2009). L'inhibition d'IRE1 augmente l'induction de l'autophagie chez la souris, ce qui suggère probablement une fonction de rétro-contrôle negatif pour limiter un éventuel excès d'autophagie induit par la voie PERK/eIF2α.

L'hypoxie et l'anoxie (correspondant respectivement à une concentration d'oxygène <3% et 0,1%) induisent l'autophagie à travers différents mécanismes. L'autophagie induite par l'hypoxie dépend du facteur de transcription HIF (Majmundar et al 2010, Mazure & Pouyssegur 2010). Lorsque la concentration en oxygène est inférieure au 5%, la sous-unité α de HIF est stabilisée et la transcription des gènes dépendants de HIF est activée. Parmi ceux-ci, on retrouve BNIP3 et BNIP3L, 2 protéines *BH3-only* qui peuvent perturber l'interaction Bcl-2/Beclin-1 et permettre la formation d'un complexe entre Beclin-1 et d'autres protéines, parmi lesquelles UVRAG et la PIP3 kinase Vps34, essentielle à l'activation de l'autophagie (Bellot et al 2009). D'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'activation de l'autophagie en conditions d'hypoxie ou d'anoxie sévères : la protéine DJ-1, dont les mécanismes de régulation ne sont pas encore connus ; la stimulation d'AMPK par stress métabolique et l'UPR du RE (Mazure & Pouyssegur 2010). Il est intéressant de noter que l'activité de la kinase PERK et la phosphorylation de eIF2α sont nécessaires à une activation maximale de l'autophagie, ce qui confirme l'importance de la phosphorylation de eIF2α, et donc d'une réduction globale de l'anabolisme, comme mécanisme régulateur de l'autophagie (Rouschop et al 2010, Kroemer et al 2010).

Le stress oxydant et le dommage à l'ADN sont aussi des inducteurs d'autophagie à travers différents mécanismes. Le peroxyde d'hydrogène exogène peut activer PERK, inhiber mTOR (Liu et al 2008) ou oxyder et activer la protéase Atg4, accélèrant ainsi la formation des autophagosomes (Scherz-Shouval et al 2007). D'ailleurs, la réponse cellulaire au stress oxydant implique souvent l'activation des voies de MAPK (mitogen-activated protein kinase), parmi lesquelles JNK1 active l'autophagie (Wong et al 2010). Les dommages à l'ADN stimulent l'expression de gènes pro-autophagiques via la protéine oncosuppressive TP53 (Kroemer et al 2010). De façon intéressante, un rôle double a été rapporté pour TP53 dans le contrôle de l'autophagie (Green & Kroemer 2009). Celle-ci exerce une activité de facteur de transcription au niveau nucléaire et parmi les gènes cibles de TP53 il y a plusieurs gènes pro-autophagiques ; en revanche, les mécanismes de son activité inhibitrice de l'autophagie lorsqu'elle présente dans le cytoplasme ne sont pas encore complètement élucidés (Gan & Guan 2008, Green & Kroemer 2009).

L'autophagie a aussi un rôle central dans le contrôle de la qualité des mitochondries et par conséquent dans l'élimination de celles qui sont endommagées par une autophagie sélective nommée mitophagie (Wang & Klionsky 2011). Lors d'un stress sublétal, une fraction des mitochondries subit la perméabilisation de la membrane, un des signaux qui précèdent la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Kroemer et al 2007). Les mitochondries dépolarisées peuvent être reconnues par la machinerie autophagique grâce à l'intervention d'une kinase mitochondriale, PINK1, qui est sensible au changement de potentiel transmembranaire (Narendra et al 2010). A la suite de la dépolarisation mitochondriale, PINK1 s'accumule sur la surface de la mitochondrie et permet le recrutement de l'ubiquitine ligase de type E3 Parkin (Narendra et al 2010). Parmi les cibles de Parkin, on trouve VDAC1, une protéine majoritaire de la membrane mitochondriale externe. L'ubiquitination de VDAC1 permet le recrutement de la protéine p62/SQSTM1, ce qui aboutit à l'élimination de la mitochondrie par autophagie (Geisler et al 2010). Il est intéressant de noter que les mécanismes de formation des vésicules autophagiques peuvent être différents dans la mitophagie et l'autophagie induite par carence en nutriment. Il a été montré qu'au cours de la mitophagie ou de l'élimination d'agrégats protéiques, la formation d'autophagosome nécessite l'activité d'une déacetylase qui se lie à l'ubiquitine (HDAC6), tandis que l'absence de HDAC6 n'altère pas le processus autophagique induit par une carence en nutriment (Lee et al 2010).

L'autophagie est, d'un point de vue biochimique, un processus multi-étapes complexe, finement contrôlé et conservé chez les eucaryotes de la levure aux mammifères (Figure 10). Nous allons décrire les détails moléculaires des différentes étapes de l'autophagie chez les mammifères.

La première étape consiste en l'initiation et la nucléation de la membrane qui formera ensuite la vésicule autophagique. Cette première structure est appelée *pre-autophagosomal structure* (PAS) ou phagophore et ses origines peuvent être multiples : la membrane du RE, la membrane externe de la mitochondrie ou même la membrane plasmique (Axe et al 2008, Ravikumar et al 2010). Les protéines kinases unc-51-like kinases (ULK 1,2 et 3), orthologues de Atg1 chez la levure, jouent un rôle central dans l'induction de l'autophagie (Yang & Klionsky 2010). En conditions normales (présence de nutriment) mTOR inhibe par phosphorylation ULK1 (ou ULK2) qui forme un complexe avec d'autres protèines, parmi lesquelles des cibles de son activité kinase, Atg13 et FIP200. Quand mTOR est inhibée (par exemple lors d'une carence en nutriment), ULK1 est activée par déphosphorylation et elle phosphoryle FIP200 et Atg13, ce qui permet la formation du phagophore (Figure 10A)(Kroemer et al 2010).

Malgré que les détails biochimiques de l'activation en aval des constituants pro-autophagiques par le complexe ULK ne soient pas encore connus, lorsqu'il est actif, il phosphoryle Ambra1, protéine du complexe Bécline 1/Class III PI3K (phosphatidyl inositol 3-phoshate kinase de class

III) (Di Bartolomeo et al 2010). Ce complexe comprend Bécline 1, la PI3K de classe III Vps34, Ambra 1 (He & Levine 2010). D'autres protéines, comme UVRAG (UV radiation resistence-associated gene), Atg14L ou Bif-1/endophilin B1 peuvent interagir avec Bécline 1, modulant positivement l'activité de Vps34 et la genèse de phosphatidyl inositol 3-phoshate (PI3P), permettant le recrutement d'autres protéines nécessaires à la nucléation de la vésicule. (Kroemer et al 2010).

D'ailleurs, il existe d'importants régulateurs négatifs de l'autophagie qui exercent leur activité à travers une interaction avec Bécline 1. Ces inhibiteurs appartiennent aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) (Maiuri et al 2007). En présence d'un stimulus pro-autophagique, ces interactions inhibitrices sont interrompues par différents mécanismes, tels que la phosphorylation de Bcl-2 ou du domaine BH3 de Beclin 1, ou la compétition avec des protéines pro-apoptotiques (BNIP3, Bad, Bik, Noxa, Puma et BimEL) (Pattingre et al 2009, Maiuri et al 2007, Bellot et al 2009). L'étape suivante consiste en l'élongation et la formation de l'autophagosome (Figure 10C). La membrane croît et commence à entourer les macromolécules et les organites cytoplasmiques. Cette étape nécessite deux systèmes de conjugaison «ubiquitin like». Le premier système permet la conjugaison covalente entre Atg12 et Atg5 grâce aux enzymes E1-like Atg7 et E2-like Atg10. Le complexe Atg12/Atg5 interagit de façon non covalente avec Atg16 pour former un «manteau» (coating) sur le feuillet cytosolique de la membrane du phagophore (Yang & Klionsky 2010).

Les concentrations de Atg5 peuvent être contrôlées par les calpaïnes, cystéine protéases dépendantes du calcium : une réduction du Ca^{2+} cytosolique augmente la disponibilité de Atg5 entier et la formation du complexe pro-autophagique Atg12/Atg5 (Xia et al 2010). Le deuxième système permet la conjugaison covalente entre la glycine de la protéine LC3 et la phospholipide phosphatidyléthanolamine (PE) grâce à l'action séquentielle de la protéase Atg4, et des enzymes E1-like Atg7 et E2-like Atg3. La conjugaison du PE à LC3 (LC3-II) permet l'association stable de LC3-II aux deux faces de la membrane de l'autophagosome et sa détection biochimique et microscopique est utilisée pour mesurer l'autophagie (Mizushima et al 2004). Une fois l'autophagosome formé, le manteau est désassemblé et il y a le clivage de la liason LC3-PE par Atg4. Cela permet le recyclage des différentes protéines et leur réutilisation pour former d'autres autophagosomes (Yang & Klionsky 2010). L'autophagosome dépourvu des protéines du manteau est appelé amphisome et sa membrane externe débute la fusion avec la membrane des vésicules endosomales tardives, apportant des hydrolases et des ions H^+, ce qui diminue le pH de la lumière de l'amphisome. Ensuite l'amphisome est adressé vers les lysosomes et la fusion entre amphisome et lysosome est effectuée par les protéines LAMP 1, 2 (lysosome-associated membrane protein 1 and 2) et RAB 7 (une GTP-binding protein) (Corcelle et al 2009). La fusion avec les lysosomes

apporte plus d'hydrolases et acidifie ultérieurement le pH, aboutissant à la formation d'un autophagolysosome.

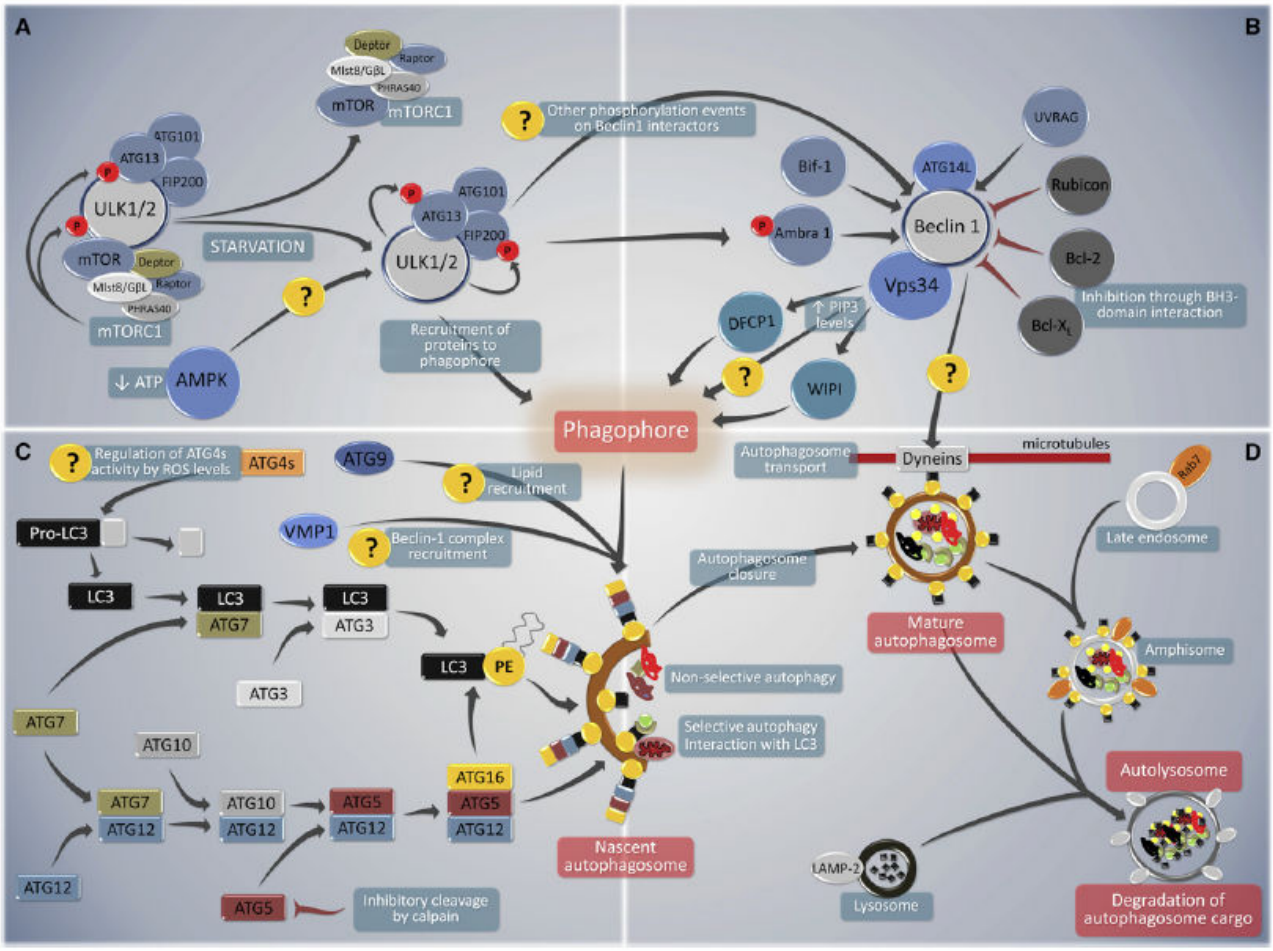


Figure 10. Schéma général et composants majeurs de l'autophagie chez les mammifères. Les inducteurs de l'autophagie, comme la carence des nutriments, modulent l'interaction inhibitrice entre TORC1 et le complexe ULK1/2. A travers la phosphorylation de Ambra 1, le complexe ULK1/2 (A) régule l'activité du complexe Beclin 1//class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (B). Beclin 1 interagit avec différents facteurs qui augmentent (bleu) ou inhibent (gris) son lien avec Vps34, l'unité catalytique de PI3K, dont l'activité de kinase lipidique est essentielle pour l'autophagie. Au delà de ces complexes, la formation des autophagosomes nécessite la participation de deux systèmes de conjugaison du type ubiquitine (Atg12/Atg5 et Atg8/LC3) (C) Le deux systèmes de conjugaison sont essentiels pour la biogenèse de la membrane, appelée aussi, « phagophore ». De plus, le système ATG8/LC3 est nécessaire pour le transport et la maturation de l'autophagosome. Les autophagosomes matures peuvent fusionner avec des endosomes tardifs possédant la protéine Rab7 pour former des amphisomes. En fin, les autophagosomes ou amphisomes fusionnent leurs membranes avec les lysosomes acides pour acquérir les enzymes hydrolytiques nécessaires à dégrader leur cargo, et recycler les molécules essentielles dans le cytoplasme (D). Adapté par Kroemer et al 2010.

La membrane interne et le matériel cytoplasmique sont dégradés en acides aminés, acides nucléiques et acides gras par des hydrolases pH dépendant, les cathepsines (B, D, L) (Kroemer & Jaattela 2005). Ces éléments simples quittent le lysosome par des pores membranaires pour être réutilisés par la cellule.

De nombreuses études récentes ont montré l'implication de l'autophagie dans différentes conditions pathologiques du foie.

Des premières études des années 70-80 avaient déjà montré la présence de l'autophagie dans le contexte des lésions d'ischémie/reperfusion (Mortimore & Schworer 1977, Schneider & Gorschboth 1983). Dans un contexte d'hépatectomie partielle, nous avons montré que, dans des foies stéatosiques et présentant des atteintes vasculaires suite à des cycles de chimiothérapie, l'autophagie induite par un preconditionnement ischémique est corrélée avec une diminution de la nécrose (Domart et al 2009, Degli Esposti et al 2010). Nous avons également montré une induction de l'autophagie dans des biopsies de greffons stéatosiques soumis à un préconditionnement ischémique et, de façon intéressante, la présence de l'autophagie était corrélée avec une diminution des épisodes de rejet aigu et chronique et avec une tendance à la diminution de l'index nécrotique (Degli Esposti et al 2011). D'autres études récentes montrent des résultats qui suggèrent, dans leur ensemble, que l'induction de l'autophagie peut avoir un effet protecteur pour les hépatocytes dans le cas d'une ischémie suivi par une reperfusion (Shin et al 2008, Kim et al 2008). Cependant, l'absence de données qui concernent l'interaction entre les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires dans ce contexte pro-autophagique limite encore la compréhension du rôle de l'autophagie dans les lésions d'ischémie/reperfusion (Rautou et al 2010).

Au delà de son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie a été récemment reconnue comme une composante de l'immunité innée et adaptative (Rautou et al 2010).

Dans le contexte des hépatites virales, il est intéressant de remarquer comment les virus de l'hépatite C et B ont développé des stratégies pour utiliser la machinerie de l'autophagie à leur bénéfice. En particulier l'autophagie est nécessaire pour les premières phases de la réplication du virus de l'hépatite C (Dreux et al 2009) et elle accroît significativement la réplication du virus de l'hépatite B pendant la phase de réplication de l'ADN, mais faiblement pendant la transcription de l'ARN (Sir et al 2010).

Les données concernant le rôle de l'autophagie dans les lésions hépatiques aigues sont rares; chez l'homme, les seules données disponibles ne montrent pas une induction de l'autophagie, sauf dans des cas d'insuffisance hépatique dans un contexte d'*anorexia nervosa* (Rautou et al 2008).

Dans le cas des hépatopathies alcooliques, l'autophagie est réduite dans les hépatocytes (Harada et al 2010, Zatloukal et al 2007). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés, mais

l'ethanol cause une diminution de l'activité de l'AMPK (qui inhibe mTOR, activant ainsi l'autophagie) et aussi une altération du trafic vésiculaire dans les hépatocytes, nécessaire à un fonctionnement correct de l'autophagie (You et al 2010, Kochl et al 2006). La diminution de l'activité autophagique peut contribuer aux conséquences pathologiques de l'abus d'alcool, comme la formation des corps de Mallory, dans lesquels on retrouve la protéine autophagique p62 (Komatsu et al 2010).

Récemment, il a été montré que l'autophagie est impliquée dans le métabolisme hépatocytaire des lipides, suggérant son implication dans la pathogenèse de la NAFLD (Singh et al 2009). L'autophagie des réserves lipidiques est nommée macrolipophagie. Comme dans l'autophagie, dans la macrolipophagie on observe des vésicules à double membrane qui entourent de gouttelettes lipidiques et les adressent vers le compartiment lysosomial où les lipides sont dégradés en acides gras et glycérol. La présence de cette voie de dégradation des lipides, alternative aux lipases cytosoliques, explique la capacité du foie à mobiliser aussi rapidement des quantités importantes de lipides, bien que le contenu en lipases soit modeste comparé à ceux des adipocytes (Zechner et al 2009, Czaja 2010). Dans des modèles murins d'obésité chronique et d'insulino-résistance génétique (souris *ob/ob*) et diététique (régime à contenu élevé en graisses), l'augmentation de la disponibilité des lipides est corrélée avec une diminution des marqueurs autophagiques dans le foie (Singh et al 2009, Czaja 2010, Yang et al 2010, Liu et al 2009). Les mécanismes qui ont été proposés concernent des inhibitions tant transitoires qu'à long terme. La voie mTOR peut induire les inhibitions de courte durée, alors que la régulation de longue durée dépendrait du contrôle transcriptionnel par le facteur FoxO, celui-ci étant inhibé par l'activation de protéines kinase B induite par l'insuline (Liu et al 2009). Dans l'obésité, l'autophagie tend à être diminuée. Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent expliquer ce déclin. Premièrement, le fait que l'obésité augmente l'expression de la protéase calpaïne 2, qui clive la protéine Atg7, essentielle à la formation de l'autophagosome, deuxièmement le fait que, dans des conditions d'obésité, l'activation de mTOR soit augmentée à cause de l'excès d'acide aminés provenant de l'alimentation (Yang et al 2010, Codogno & Meijer 2010).

L'autophagie semble avoir un rôle double dans l'établissement de l'inflammation dans le contexte de l'obésité. D'un coté, un défaut d'autophagie augmente et entretient le stress RE causé par l'excès d'alimentation, ce qui contribue au développement d'une insulino-résistance (Yang et al 2010, Hotamisligil 2010). De l'autre coté, il a été montré que, dans les adipocytes, l'induction d'un stress RE est suffisante à induire une dégradation de l'adiponectine, adipokine anti-inflammatoire, dépendante de l'autophagie (Zhou & Liu, 2010).

Le dysfonctionnement de l'autophagie a été corrélé avec le développement du cancer, notamment à cause de la délétion mono-allélique du gène bécline 1 dans 40-75% des cancers du sein, ovarien, et de la prostate (Morselli et al 2009, Mathew et al 2007). En ce qui concerne le carcinome hépatocellulaire, des études *in vitro*, chez la souris et chez l'homme, ont confirmé que l'autophagie joue un rôle suppresseur de tumeur, bien que les mécanismes oncosuppresseurs de l'autophagie ne soient pas encore élucidés (Qu et al 2003, Ding et al 2008). Même s'il semble paradoxal qu'n mécanisme essentiellement pro-survie soit anti-tumoral, certaines fonctions «anti-tumorales» de l'autophagie ont été proposées, notamment la capacité de limiter l'instabilité génomique, la diminution du stress oxydant, de la nécrose intra-tumorale et de l'inflammation locale (Morselli et al 2009, Mathew et al 2007).

IV. La tolérance à la mort cellulaire comme mécanisme impliqué dans la cancérogenèse hépatique

La tolérance à la mort est un des aspects caractéristiques des cellules cancéreuses. Au cours du développement tumoral ou de la radio/chimiothérapie, les cellules tumorales rencontrent des conditions de stress physiologique qui normalement induisent l'apoptose, connue pour être une mort programmée qui s'oppose à la tumorigenèse (Hanahan & Weinberg 2011). Cependant, il est aussi bien établi que les senseurs classiquement impliqués dans le transfert de signaux qui emmènent ensuite à l'exécution du programme apoptotique sont souvent anormaux (Adams & Cory 2007). Une des anomalies les plus fréquentes est la perte de fonction de TP53, qui active l'apoptose en réponse à un endommagement excessif de l'ADN (Juntilla & Evan 2009). Les cellules tumorales utilisent de nombreuses stratégies pour limiter la mort apoptotique : une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L) ou des facteurs favorisant la survie (Insulin-like growth factors 1 et 2), ou bien encore une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) (Hanahan & Weinberg 2011). D'ailleurs, le développement d'une tolérance à la mort cellulaire peut être un événement qui survient assez précocément au cours de la tumorigenèse, car il semble nécessaire à une progression vers un grade de malignité avancée (Lowe et al 2004).

Comme nous l'avons précédemment décrit, le développement de la NAFLD vers la NASH est un facteur de risque pour le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Page & Harrison 2009). L'obésité est à la fois un facteur de risque reconnu pour la NASH et le CHC (Caldwell et al 1999). Il a été reporté un risque relatif de développer un cancer du foie de 1,68 et 4,52 respectivement chez des femmes ou des hommes obèses par rapport aux sujets du même sexe non-obèses (Calle et al 2003). Le diabète de type 2 est un autre élément clé du syndrome métabolique caractérisé par l'insulino-résistance (Page & Harrison 2009) et un facteur de risque pour la NASH et le CHC (Adams et al 2005, El-Serag et al Gastroenterology 2004). De façon préoccupante, il a été montré que l'obésité et le diabète de type 2 ont un effet synergique sur le risque de développement d'un CHC (Polesel et al 2009, Chen et al 2008).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux mécanismes de tolérance à la mort cellulaire dans des foies stéatosiques humains et dans des modèles cellulaires de NASH. Nous avons utilisé à ce but le modèle du préconditionnement ischémique (PI), une technique décrite pour la première fois dans le cœur par Murry et al (1986), qui consiste, grâce à de courtes périodes d'occlusion vasculaire avant l'ischémie, à conférer une protection contre les lésions d'I/R.

IV.1 Le préconditionnement ischémique comme modèle d'étude des mécanismes de tolérance à la mort cellulaire

Les lésions d'ischémie/reperfusion sont caractérisées par une nécrose cellulaire et une réponse inflammatoire. La nécrose est causée essentiellement par l'absence d'oxygène et elle peut s'établir quelques minutes après l'ischémie dans certains tissus tels que le cœur et le foie (Farber et al 1981). La réponse inflammatoire est déclenchée par l'effet oxydant de la reperfusion et elle peut amplifier les lésions ischémiques tant au niveau local que systémique (Parks & Granger 1986).

C'est en 1986 que Murry et al montraient pour la première fois le phénomène du PI sur les cœurs dans un modèle expérimental chez le chien. Il a montré qu'après 40 minutes d'occlusion des coronaires, la zone d'infarctus chez les animaux préconditionnés était inferieure de 70% par rapport aux contrôles (Murry et al 1986). Le PI était efficace en quelques minutes et pour 2-3 heures, ce qui suggère le déclenchement de médiateurs des effets à court terme. Des agonistes libérés localement, tels que l'adénosine, la bradykinine, les catécholamines ou les opioïdes peuvent induire une réponse protective en se liant à des récepteurs de membrane couplés aux protéines G (Cohen et al 2000). De façon intéressante, il a été décrit qu'une deuxième fenêtre de protection se produisait après environ 24h du PI (Kuzuya et al 1993) avec une durée prolongée de 48-96 heures mais moins protectrice (Bolli 2000).

Le PI induit une tolérance à l'ischémie par différents mécanismes (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005) synergiques qui ont comme dénominateur commun la diminution de la consommation d'ATP.

De façon générale, le PI réduit la demande d'énergie pendant l'ischémie (Jennings et al 2001). Un des mécanismes de *downregulation* du métabolisme semble passer par l'activation de l'AMPK qui inhibe la glycolyse (Vincent et al 1992). D'ailleurs l'AMP, activateur allostérique de l'AMPK augmente au cours du PI (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005) et l'inhibition de l'AMPK élimine les bénéfices du PI chez le rat (Peralta et al 2001). Un des mécanismes proposés est l'amélioration de l'efficacité du réseau de transfert énergétique (Pucar et al 2001). En effet la production d'ATP est physiologiquement couplée aux sites d'utilisation par des voies enzymatiques comprenant la créatine kinase, l'adenylate kinase et les enzymes glycolytiques (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005). Une étude par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire a montré que le PI change la distribution des phosphates à haute énergie, ce qui rend le réseau de transfert énergétique plus performant (Pucar et al 2001). Un autre mécanisme consiste en une restriction du passage passif de ions à travers la membrane plasmique, ce qui permettrait de diminuer l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, enzyme qui utilise des grandes quantités d'ATP pour garder le potentiel de membrane, en réajustant l'équilibre énergétique (Hochachka 1986). Ce

mécanisme protège ainsi de l'accumulation intracellulaire de Na^+, qui serait suivi par un influx d'eau et qui aboutirait à un gonflement et à une rupture de la cellule. De plus, pendant une ischémie prolongée, on observe une accélération de la glycolyse anaérobie, qui induit une production de H^+ et une acidose dans le tissu ischémique (Dennis et al 1991). Lors de la reperfusion, on observe un rétablissement trop rapide du pH intracellulaire et un influx de Na^+ et Ca^{2+} via le transporteurs Na^+/H^+ et Na^+/Ca^{2+}, ce qui peut provoquer une nécrose cellulaire (Scholz & Albus 1993). En effet il a été montré que le PI prévient l'accumulation de Na^+ intracellulaire et l'acidose dans les hépatocytes de rat soumis à anoxie prolongée (Carini et al 2000). L'équilibre ionique à travers les membranes interne et externe de la mitochondrie est aussi essentiel pour l'intégrité de la cellule. Le PI garde ouvert les canaux K_{ATP} des mitochondries, en réduisant l'accumulation du calcium dans la matrice, ce qui protège de la libération des médiateurs apoptotiques de la mitochondrie. (Wang et al 2001). Enfin, il a été montré que le PI peut activer des voies de signalisation qui favorisent la survie cellulaire, notamment NF-κB qui, *via* la voie de MAPkinase, permet aux hépatocytes préconditionnés d'entrer dans le cycle cellulaire après ischémie prolongée (Teoh et al 2002).

Le PI induit une tolérance à la reperfusion, notamment par des mécanismes divers concernant la régulation du stress oxydant (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005). En effet la reperfusion, bien que nécessaire pour rétablir la phosphorylation oxydative et éliminer l'accumulation des produits toxiques formés au cours de l'ischémie, a des conséquences locales et systémiques importantes (Grace 1994). Une partie des ERO est produite au cours de la dégradation de la xanthine par la xanthine oxydase (XO) et ils sont les principaux responsables des lésions de reperfusion. Dans les tissus sains, 90% de cet enzyme est dans sa forme de déshydrogénase (XD). Au cours de l'ischémie, l'influx de Ca^{2+} active des protéases qui catalysent la conversion de la XD en XO dans les cellules endothéliales (McCord et al 1985). Cela prédispose à la génération des ERO lors de la reperfusion et par conséquence aux lésions tissulaires dues à la peroxydation des membranes et à l'activation des leucocytes (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005). Le PI diminue la conversion de la XD en XO dans les foies des rats soumis à une ischémie froide, ce qui s'accompagne à une diminution du stress oxydant (Fernandez et al 2002). De plus, il a été montré que le PI diminue l'activation des cellules de Kupffer et maintient le potentiel redox des mitochondries dans les foies de rat (Glanemann et al 2003). L'homéostasie mitochondriale semble jouer un rôle central dans le contrôle des lésions I/R, car la mitochondrie est source importante d'ERO, organelle clé dans l'homéostasie du Ca^{2+} et intégrateur des signaux qui déterminent la survie ou la mort cellulaire (Kroemer et al 2007). Le PI semble favoriser la conservation de l'intégrité de la membrane mitochondriale, ce qui est suggéré par une diminution de la libération du Apoptotic Inducing Factor (AIF) et l'inhibition de la perméabilité du pore de transition

mitochondriale, dont l'ouverture peut initier l'apoptose (Kim & Han 2003, Hausenloy et al 2002). De plus, il a été montré que le PI diminue la concentration hépatique de TNFα, un inducteur important de l'apoptose dans le foie, modulant la mort caspase dépendante (Yadav et al 1999).

Au delà des effets cellulaires observés, le PI peut également moduler des réponses systémiques telles que la microcirculation et la réponse inflammatoire (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005). Après reperfusion, on peut observer un phénomène connu sous le nom de *no reflow phenomenon.* Il consiste en une absence de reperfusion (jusqu'à 30% du lit vasculaire) causée par une nécrose post-ischémique des cellules endothéliales, une diminution de biodisponibilité de NO et une activation des plaquettes et neutrophiles (Rezkalla & Kloner 2002, Dayton et al 2002). Le PI diminue ce phénomène par une augmentation de la production des molécules vasodilatatrices, telles que les eicosanoides et le NO (Lefer & Lefer 1996, Peralta et al 1996). La reperfusion permet d'ailleurs aux cytokines inflammatoires produites pendant le stress hypoxique de circuler à distance du site de production, aboutissant à une réponse inflammatoire systémique (Pasupathy & Homer-Vanniasinkam 2005). De façon intéressante, il a été montré que les rats dont le foie avait été préconditionné, présentaient à la fois des concentrations hépatiques moindres de TNFα et une diminution de l'expression de la P-selectine, protéine que permet l'adhérence et l'infiltration de neutrophiles dans des organes éloignés (Peralta et al 2001). De plus, l'équipe de notre laboratoire et l'équipe de C. Peralta ont montré de façon indépendante que le PI exerce une activité anti-inflammatoire en modulant la synthèse de NO et l'action de l'IL-1 (Barrier et al 2005, Franco-Gou 2006). Au cours de la transplantation hépatique, l'activation de l'AMPK, une kinase centrale dans la régulation du métabolisme énergétique, est augmentée par le PI tant dans les foies stéatosiques que dans les foies non stéatosiques. L'AMPK induit la synthèse de NO, pour lequel un rôle protecteur pour les greffons a été confirmé (Carrasco-Chaumel et al 2005).

Enfin, il est intéressant de noter que les effets du PI ne sont pas toujours les mêmes dans le foies stéatosiques par rapport au non-stéatosiques, les réponses étant parfois modulées soit par des mécanismes moléculaires différents soit par une intensité différente du même mécanisme. Dans les greffons stéatosiques, une plus grande quantité de xanthine et xanthine oxydase a été observée par rapport aux greffons non stéatosiques. Celle-ci était corrélée à une augmentation de la peroxydation lipidique (Fernandéz et al 2004). Le PI diminuait les concentrations de xanthine et de xanthine oxydase dans les foies stéatosiques. Il a été décrit que les foies stéatosiques sont plus prédisposés à subir une diminution de PPAR-α, un facteur de transcription qui régule l'inflammation au niveau hépatique, de façon concomitante avec une surexpression d'adiponectine à la suite d'un I/R (Massip-Salcedo et al 2008). Cette condition, induite par les MAP kinases, résulte en une augmentation du stress oxydant et des lésions hépatiques. Le PI montre un effet agoniste dans

l'activation de PPARα, ce qui inhibe l'activation de MAP kinase et l'accumulation d'adiponectine, avec pour résultat une diminution du stress oxydant et des lésions d'I/R (Massip-Salcedo et al 2008).

Il est remarquable que les foies stéatosiques, qui présentent une capacité de synthèse de l'ATP détériorée (Peralta et al 2001), soient aussi ceux qui bénéficient plus des effets métaboliques du PI. Le PI a un meilleur effet de maintien sur l'activité de l'ATP synthétase et le taux de respiration mitochondriale dans les foies stéatosiques par rapport aux foies non stéatosiques dans un modèle animal d'I/R chaude (Rolo et al 2009). Nous avons montré que des greffons stéatosiques soumis à PI présentent une activation de l'autophagie significativement plus importante par rapport aux foies préconditionnés non stéatosiques et que l'autophagie est activée par le PI dans les foies rendus stéatosiques à la suite d'une chimiothérapie (Degli Esposti et al 2011, Domart et al 2009). L'autophagie, dont les détails biochimiques ont été décrits dans le chapitre précédent, est un mécanisme catabolique qui permet de recycler des acides aminés et d'autres composants moléculaires simples à partir de la dégradation de protéines et d'organelles endommagées (Mizushima et al 2008). L'autophagie est rapidement induite lorsque la cellule nécessite de générer de l'énergie et des nutriments par exemple dans le cas de carence en nutriments (Mizushima et al 2008). Dans le contexte de l'I/R des foies stéatosiques, il est possible que l'autophagie vienne lutter contre une déplétion d'ATP pour retarder la mort cellulaire. L'autophagie représente donc un mécanisme au carrefour de l'homéostasie métabolique et de la survie cellulaire, dont un fonctionnement dérégulé est impliqué dans différentes pathologies hépatiques (Rautou et al 2010).

IV.2 Le risque de cancérogenèse par un excès de tolérance aux stress chroniques

L'incidence du développement d'un carcinome hépatocellulaire chez des patients suivis pour NASH est rapporté depuis peu dans de grandes séries, bien que les chiffres soient variables (Page & Harrison 2009). Les mécanismes de cancérogenèse sont encore méconnus. Les liens les plus probables sont 1) la production accrue d'ERO et leurs conséquences sur les attaques radicalaires des macromolécules, notamment les acides nucléiques ou encore les protéines des systèmes de réparation des anomalies de l'ADN ; 2) la libération de débris cellulaires et de cytokines pro-inflammatoires au cours de la nécrose, notamment l'IL-1, provoquant une inflammation chronique faisant le lit de développement de tumeurs primitives, et « 3) un défaut de mort cellulaire programmée aboutissant à la survie de cellules portant des anomalies génétiques qui pourront être transmises à la descendance. C'est ce dernier aspect, qui implique l'autophagie et la mitophagie, décrites précédemment, que nous allons discuter.

Le concept de la mort cellulaire programmée par apoptose des cellules constituant un rempart naturel contre le développement d'une tumeur primitive a été décrit par plusieurs études au cours des dernières années (Adams and Cory 2007, Lowe et al 2004, Evan and Littlewood 1998). D'autres ont montré que l'apoptose est atténuée dans les tumeurs qui deviennent malignes et dans celles qui résistent à la thérapie (Adams and Cory 2007, Lowe et al, 2004).

L'activation du programme apoptotique utilise deux voies distinctes mais convergentes, la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. La convergence de ces deux voies, qui passe par l'interaction des protéines adaptatrices (complexe de signalisation de mort, DISC), se réalise au niveau de l'activation d'une famille d'enzymes connue sous le nom de caspases (contraction de cystein-dependent aspartate specific protease). Le signal apoptotique qui transmet le message entre les protéines régulatrices et les protéines effectrices de l'apoptose (les caspases) est contrôlé par la balance entre membres pro- et antiapoptotiques de la famille de Bcl-2 (Adams and Cory 2007). Bcl-2 et les protéines de la même famille (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) sont des inhibiteurs de l'apoptose. Leur mécanisme d'action consiste à lier et inhiber deux protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) qui, si elles sont activées, forment des pores dans la membrane externe des mitochondries causant la libération dans le cytosol d'autres médiateurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c ou AIF (Adams and Cory 2007). D'autres protéines pro-apoptotiques ne possèdent que le domaine 3 d'homologie à Bcl-2, nommées protéines *BH3-only* (Kuwana et al 2005). Ces protéines se lient aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en les inhibant, ce qui permet l'activation de Bax et Bak (Leber et al 2007).

Les conditions déclenchant l'apoptose ne sont pas toutes connues. Toutefois il a été montré que diverses anomalies des acteurs de l'apoptose jouent un rôle clé dans le développement des tumeurs (Adams and Cory 2007, Lowe et al, 2004).

Les cellules cancéreuses acquièrent différentes stratégies pour échapper à l'apoptose. La plus commune est la perte de fonction de la protéine TP53, un senseur qui active l'apoptose à la suite d'un endommagement de l'ADN. Les tumeurs peuvent aussi détourner l'apoptose à travers une expression accrue des régulateurs antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) ou de signaux de survie, tels que l'Insulin-like growth factors 1 et 2 ; voire à travers une diminution des facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma), ou par un court-circuit de la signalisation des récepteurs de mort (Hanahan & Weinberg 2011). La multiplicité des mécanismes pour échapper à l'apoptose reflète les différents types de stress que les populations des cellules tumorales rencontrent pendant leur évolution vers la malignité (Hanahan & Weinberg 2011).

Un dysfonctionnement de l'apoptose est caractéristique du processus de cancérogenèse hépatique (Schattenberg et al 2011). Une diminution de la sensibilité à la signalisation du récepteur

de mort CD95/Fas contribue à la transformation maligne des hépatocytes (Lee et al 2001). L'inhibition de l'apoptose à travers une diminution de l'expression de protéines adaptatrices des DISCs est aussi un mécanisme commun par lequel les cellules transformées évitent la mort cellulaire (Schuchmann et al 2003). Cependant, un taux apoptotique élevé est corrélé avec la présence des processus inflammatoires et fibrogéniques (Vick et al 2009, Takehara et al 2004). Les lésions et le renouvellement des hépatocytes sont aussi essentiels pour déclencher la transformation maligne des cellules hépatiques. En effet, l'élimination des cellules par apoptose favorise la prolifération hépatocytaire (Malhi et al 2010). L'interaction entre le renouvellement cellulaire dû à l'apoptose, un stimulus constant pro-apoptotique et la réponse fibrotique de la matrice extracellulaire donne lieu à un microenvironnement favorisant le développement d'un cancer du foie (Malhi et al 2010).

Si l'apoptose et les stratégies utilisées par les cellules cancéreuses afin d'éviter l'apoptose sont connues depuis longtemps, c'est seulement au cours de la dernière décennie que le concept de mort programmé devient plus large, grâce à la compréhension des interrelations entre l'apoptose et d'autres formes de mort cellulaire, telles que la nécrose, la necroptose et la mort autophagique (Hanahan & Weinberg 2011). D'ailleurs ces interrelations correspondent à une intégration de l'état métabolique de la cellule avec les stress endogènes (ERO, stress du RE) et exogène (cytokines et adipokines, hypoxie).

L'autophagie, comme nous l'avons décrit auparavant, représente une réponse physiologique qui, comme l'apoptose, fonctionne à un niveau basal faible, mais qui peut être fortement induite dans certaines conditions de stress, la plus connue étant la carence en nutriments (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al, 2004). Des études récentes ont montré une interaction entre les circuits de régulation de l'autophagie, l'apoptose et l'homéostasie cellulaire. C'est le cas des signalisations des kinases PI3-kinase, AKT, et mTOR kinases, qui sont activées par des signaux de survie qui bloquent à la fois l'apoptose et l'autophagie (Levine and Kroemer, 2008; Sinha & Levine, 2008; Mathew et al, 2007). Lorsque les signaux de survie ne sont pas suffisants, l'atténuation des trois voies peut donner lieu à l'activation de l'apoptose et/ou de l'autophagie (Levine and Kroemer 2008, Sinha & Levine 2008, Mathew et al 2007).

La protéine Bécline-1, dont le rôle essentiel dans l'activation de l'autophagie a été décrit dans un chapitre précédent, appartient à la famille de protéines *BH3-only*, qui possèdent un domaine pour lier les protéines Bcl-2/Bcl-x_L (Levine and Kroemer 2008, Sinha & Levine 2008). Le complexe Bcl-2/Bécline 1 rend la Bécline 1 inactive, inhibant l'induction de l'autophagie. Il est donc possible que, selon l'état physiologique de la cellule, une compétition des protéines senseurs de stress de la

famille BH3-*only* pour Bcl-2, puisse donner lieu à une induction de l'autophagie et/ou de l'apoptose (Hanahan & Weinberg 2011).

Le rôle de l'autophagie dans la cancérogenèse est complexe et dépendant du contexte (Mathew & White 2011). En effet, les souris porteuses d'allèles inactifs du gène pour Bécline 1 ou d'autres composantes de la machinerie de l'autophagie présentent une susceptibilité plus élevée au développement de cancers (White and DiPaola 2009, Levine & Kroemer 2008). Ces résultats montrent que l'autophagie est une voie qui supprime la tumorigenèse, en limitant probablement le stress oxydant et les lésions tissulaires qui peuvent déclencher l'initiation d'un cancer (White & DiPaola 2009, Mathew & White 2011).

La carence en nutriments, la radiothérapie et certains médicaments cytotoxiques peuvent induire un niveau d'autophagie qui semble permettre la survie de cellules cancéreuses (White & DiPaola 2009 Amaravadi & Thompson 2007, Mathew et al 2007). De plus, il a été montré que certaines cellules cancéreuses, soumises à des stress sévères, peuvent se rétrécir grâce à l'autophagie, entrant dans un état de dormance réversible (White & DiPaola 2009, Lu et al 2008). Cette réponse pro-survie peut permettre la persistance et éventuellement une récidive du cancer à un stade plus avancé à la suite d'un traitement de chimiothérapie Hanahan & Weinberg 2011).

L'autophagie comme processus de cancérogenèse hépatique chez les sujets atteints d'une NASH n'a pas été encore décrit, à notre connaissance. Dans ce contexte, l'accumulation de mitochondries endommagées dans les cellules stéatosiques pourrait être en partie responsable de la production d'un excès d'ERO, déclenchant une réaction inflammatoire et/ou des attaques radicalaires des acides nucléiques ou des lipides, et des protéines, en particulier celles intervenant dans la réparation des lésions de l'ADN.

Malgré les études réalisées à ce jour, les connaissances sur l'impact des altérations mitochondriales dans la genèse et l'évolution de la NASH vers un carcinome hépatocellulaire sont encore insuffisantes. Dans ce contexte, le turn over des mitochondries, plus particulièrement la modulation de la mitophagie lors de la stéatohépatite, est un mécanisme qui pourrait s'avérer important. Il est peu exploré à notre connaissance dans cette pathologie. La mitophagie, ou macro-autophagie appliquée aux mitochondries, est un processus qui garantit l'intégrité cellulaire en assurant la dégradation et le recyclage des mitochondries endommagées afin de maintenir entre autres une production d'ATP à un niveau vital. Une altération de ce processus a déjà été mise en évidence dans plusieurs cas, notamment dans les maladies neurodégénératives (Lutz et al 2009, Springer & Kahle 2011, Santos et al 2010). Une mitophagie anormale provoque une accumulation de mitochondries endommagées sources d'ERO nocives pour les composantes cellulaires, en

premières lignes desquelles se trouvent les mitochondries elles-mêmes. Ceci participe ainsi par un phénomène d'auto-amplification des ERO à la genèse d'un stress oxydant délétère pour la cellule.
Il est possible que le stress cellulaire chronique généré par la stéatose perturbe le *turn-over* des mitochondries, en particulier la mitophagie. En conséquence, l'accumulation de mitochondries endommagées dans les cellules stéatosiques serait en partie responsable de la production d'un excès d'ERO, déclenchant une réaction inflammatoire et/ou des attaques radicalaires des macromolécules, notamment les acides nucléiques. La survie de telles cellules, via l'autophagie par exemple, pourrait permettre la transmission des anomalies génétiques à la descendance et ainsi être une nouvelle voie de cancérogenèse.

En conclusion, l'autophagie semble avoir des effets contradictoires sur les cellules et donc sur la progression tumorale (White & DiPaola 2009). Il est nécessaire que la recherche à venir éclaircisse les conditions physiologiques déterminant quand et comment l'autophagie permet la survie ou cause la mort cellulaire ainsi que son rôle dans les étapes précoces de transformation tumorale.

OBJECTIFS

La stéatose hépatique, caractérisée par une accumulation de triglycérides sous forme de vésicules, est connue depuis de nombreuses années. La réponse inflammatoire engendrée par cette accumulation est également décrite depuis plusieurs années. Sa description a permis de définir « two hits » indispensables à la genèse d'une stéatohépatite ou NASH. Le premier étant l'accumulation de lipides, le second, la genèse d'un stress oxydant et la libération de cytokines. La NASH est une des conséquences pathologiques du syndrome métabolique au cours duquel une résistance des tissus à l'insuline se développe. Récemment, la composition des lipides accumulés dans la NASH a été décrite et montre la présence de cholestérol libre et de différents métabolites des acides gras dont la toxicité est grande mais variable. De façon surprenante, une nouvelle hypothèse tend à émerger quant aux rôles protecteurs de certaines espèces lipidiques. En effet, le stockage des triglycérides sous forme de vésicules pourrait être un mécanisme de survie cellulaire (Choi & Diehl 2008). Il s'agirait principalement d'une tolérance à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Dans ce contexte, l'activation de l'autophagie serait capitale et la nécrose ne serait plus un mécanisme non contrôlé, mais au contraire un système finement régulé.

La tolérance à la mort cellulaire est une des caractéristiques des cellules dont l'organe est soumis à un préconditionnement ischémique avant une ischémie-reperfusion plus longue (Murry et al 1986). Le PI entraîne la régulation positive de l'expression de gènes anti-apoptotiques ou la répression de gènes pro-apoptotiques. Ces mécanismes ont été largement décrits dans la tolérance du cœur et du foie à l'ischémie-reperfusion sans être pour autant complètement élucidés à ce jour. Cependant, ces travaux offrent des pistes intéressantes quant aux voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de tolérance à la mort cellulaire.

La tolérance à la mort cellulaire est également une caractéristique des cellules cancéreuses qui surviendrait assez précocement dans le développement tumoral. Celle-ci ne reposerait pas seulement sur la présence des mutations dans les gènes qui codent pour les protéines contrôlant l'apoptose (Hanahan & Weiberg 2011). La littérature récente a montré l'existence de systèmes de réponse aux stress impliquant un contrôle de l'homéostasie tant au niveau tissulaire qu'au niveau cellulaire (Hanahan & Weiberg 2011, Kroemer et al 2010, Hotamisligil 2010). Ces systèmes intègrent les signaux provenant du métabolisme énergétique cellulaire, de l'état du catabolisme et anabolisme cellulaires et du microenvironnement tissulaire (Sonnenschein & Soto 2008, Kroemer et al 2010). Les organelles subcellulaires, telles que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, jouent un rôle critique dans l'intégration de ces signaux (Hotamisligil 2010, Galluzzi et al 2010). Dans ce contexte, l'autophagie, un processus du catabolisme intracellulaire essentiel pour le

développement, la différentiation, la survie et l'homéostasie cellulaire, est considérée comme un des mécanismes principaux dans l'intégration de la réponse aux stress et son dysfonctionnement est impliqué dans la cancérogenèse (Kroemer et al 2010, Mathew & White 2011).

Des données expérimentales récentes suggèrent l'existence d'un réseau complexe d'interactions moléculaires qui lient dans la NASH, comme dans le cas de la cancérogenèse, le métabolisme énergétique, la réponse inflammatoire systémique et tissulaire et des altérations subcellulaires, telles que les lésions des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

L'objectif de notre travail a été d'étudier les mécanismes de tolérance à la mort cellulaire développés dans les foies stéatosiques et leurs conséquences sur la chronicité et la sévérité de la maladie ainsi que dans l'évolution de la NASH vers une tumeur primitive du foie. La compréhension de ces mécanismes permettrait une meilleure prise en charge des patients atteints des pathologies hépatiques et le développement de stratégies thérapeutiques et préventives appropriées.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire induits par un préconditionnement ischémique

I-1. Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire induits par un préconditionnement ischémique dans le parenchyme hépatique présentant une stéatose et/ou des atteintes vasculaires liées à un traitement par chimiothérapie

Article 1: Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy

Domart MC*, **Degli Esposti D***, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G, Franc B, Tanabe KK, Debuire B, Azoulay D, Brenner C, Lemoine A.

* Ces auteurs ont contribué également à ce travail

Journal of Hepatology, 2009; 51: 881-889

Article 2: Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis

Degli Esposti D*, Domart MC*, Sebagh M, Harper F, Pierron G, Brenner C, Lemoine A.

* Ces auteurs ont contribué également à ce travail

Autophagy, 2010; 6: 172-174

Situation du sujet

Les foies stéatosiques sont décrits pour être plus sensibles aux lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) que les organes non stéatosiques. Cette sensibilité a été corrélée à une diminution de la synthèse d'ATP et un flux sinusoïdal perturbé (Selzner & Clavien 2001, Peralta et al 2001, Farrell et al 2008). Le préconditionnement ischémique (PI), décrit pour la première fois dans le cœur par

Murry et al (1986), est une technique qui consiste en de courtes périodes d'occlusion vasculaire avant l'ischémie et confère une protection cellulaire contre les lésions d'I/R. Le bénéfice clinique du PI reste controversé. Au cours de l'hépatectomie, une étude prospective randomisée a montré que les bénéfices n'étaient observés que chez les sujets jeunes ou atteints de stéatose (Clavien et al 2003), d'autres équipes, dont la nôtre, n'ont pas montré de bénéfice clinique majeur (Azoulay et al 2006). Cependant, nous avons recherché si le PI, consistant dans nos conditions en 10 min d'ischémie suivies de 10 min de reperfusion précédant l'ischémie prolongée nécessaire à la résection hépatique, pouvait induire une tolérance contre la mort cellulaire due aux lésions de l'I/R des foies soumis à une chimiothérapie. En effet, la chimiothérapie néo-adjuvante que les patients reçoivent avant la chirurgie, peut induire une stéatose hépatique et des atteintes microvasculaires, qui augmentent la sensibilité du foie à l'I/R (Aloia et al 2006, Zorzi et al 2007). Un de mécanismes à la base de ces altérations pourrait être un stress du réticulum endoplasmique (RE). En effet, il a été montré qu'un traitement par chimiothérapie induit un stress du RE au niveau hépatique, celui-ci étant connu pour favoriser le développement de la stéatose (Manekeller et al 2009, Ozcan et al 2004)

Notre objectif a été d'analyser les mécanismes de mort cellulaire induits par la chimiothérapie et le bénéfice que pourrait représenter le préconditionnement ischémique dans la chirurgie des métastases hépatiques. En effet, ce type de chirurgie est fréquent car le nombre de malades concernés est grand. Peu de patients sont opérables d'emblée ; ils nécessitent une chimiothérapie pré-opératoire pour diminuer la taille et le nombre de tumeurs afin de leur offrir la possibilité d'une chirurgie. Cependant, les suites opératoires peuvent être compliquées si le foie restant présente des altérations histologiques.

Nous avons analysé des biopsies hépatiques de patients traités par chimiothérapie pour métastases hépatiques de cancer colorectal et dont le foie a été soumis (n=30) ou non (n=31) à un PI avant hépatectomie. Nous avons étudié les conséquences de celui-ci sur l'activation des voies de mort et de survie cellulaires au niveau hépatocytaire.

Résultats et discussion

Nous avons montré que le PI est associé à une diminution de la nécrose chirurgicale, sans modifier l'apoptose, selon la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) et l'étude de l'activation des caspases.

Par ailleurs, le PI induit une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les foies préconditionnés par rapport aux foies non préconditionés. L'expression de Bcl-2 est localisée au niveau centrolobulaire et co-localise avec la protéine Bécline 1, impliquée dans l'activation de

l'autophagie (Mizushima et al 2004). Nos résultats suggèrent un rôle coordonné de ces protéines dans l'induction de l'autophagie après un PI. De plus, nous avons observé une augmentation de la forme phosphorylée de Bcl-2, modification nécessaire à la dissociation du complexe Bcl-2/Bécline 1 et à l'induction de l'autophagie. Cette augmentation est associée à une diminution de l'immunoprécipitation de Bécline 1. L'observation par microscopie électronique de l'augmentation du nombre de cellules présentant des vacuoles d'autophagie, ainsi que l'augmentation du nombre de vacuoles dans ces cellules dans les foies préconditionnés, ont confirmé une activation de l'autophagie dans les foies traités par chimiothérapie et soumis à un PI. L'utilisation de la microscopie électronique reste en effet le *gold standard* pour une évaluation directe de l'autophagie (Klionsky et al 2008) et elle nous a permis de mettre en évidence pour la première fois l'activation de l'autophagie dans le contexte de la stéatose hépatique chez l'homme.

Ainsi, dans les foies présentant une stéatose et/ou une péliose liées à la chimiothérapie, nous avons montré que le PI est associé à une diminution de l'incidence de nécrose et à une activation de l'autophagie. Dans ce contexte, Bcl-2 et Bécline 1 pourraient être des protéines clés dans la régulation de la mort cellulaire lors des lésions d'I/R. Ces résultats sont à rapprocher de ceux récemment publiés et montrant que l'autophagie est un mécanisme central dans l'homéostasie des hépatocytes (Rautou et 2010). En particulier l'autophagie peut être activée pour diminuer le stress du RE, déclenché par l'accumulation de la protéine ATZ dans le cas de déficit d' α-1-antitrypsin (Perlmutter 2009). Dans ce contexte, le déclenchement d'une autophagie pourrait être un moyen de lutte de la cellule contre le stress et la mort cellulaire induits par l'I/R.

Author's personal copy

ELSEVIER

Journal of Hepatology 51 (2009) 881–889

Journal of Hepatology

www.elsevier.com/locate/jhep

Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy☆

Marie-Charlotte Domart[1,2,#], Davide Degli Esposti[1,2,3,#], Mylène Sebagh[4], Natalia Olaya[1,2], Francis Harper[5], Gérard Pierron[5], Brigitte Franc[6], Kenneth K. Tanabe[7], Brigitte Debuire[1,2], Daniel Azoulay[2,8], Catherine Brenner[9], Antoinette Lemoine[1,2,3,*]

[1] *AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94804 Villejuif Cedex, France*
[2] *Inserm U602, Institut André Lwoff-IFR89, Université Paris-Sud 11, PRES Universud-Paris, Villejuif, France*
[3] *Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry Cedex, France*
[4] *AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service d'Anatomie Pathologique, Inserm U785, Université Paris-Sud 11, Institut André Lwoff, Villejuif Cedex, France*
[5] *Institut André Lwoff, UPR-1983, Laboratoire Réplication de l'ADN et Ultrastructure du Noyau, Villejuif, France*
[6] *AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Service d'Anatomie Pathologique, Boulogne-Billancourt, Université Versailles/St Quentin, PRES Universud-Paris, Versailles, France*
[7] *Division of Surgical Oncology, Massachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA*
[8] *AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Centre Hépatobiliaire, Université Paris-Sud 11, Villejuif Cedex, France*
[9] *CNRS UMR 8159, Université Versailles/St. Quentin, PRES Universud-Paris, Versailles, France*

***Background/Aims*: Liver pathology induced by chemotherapy (steatosis or vascular injury) is known to increase the liver's sensitivity to ischemia/reperfusion (I/R) injury, thereby increasing morbidity and mortality after liver resection. Our aim was to assess whether ischemic preconditioning (IP) reduces I/R injury to livers with chemotherapy-induced pathology.**

***Methods*: We analyzed a series of livers from patients treated with chemotherapy for colorectal cancer who underwent IP ($n = 30$) or not ($n = 31$) before hepatectomy. All but one of the livers exhibited chemotherapy-induced steatosis and/or peliosis before the I/R insult.**

***Results*: Necrosis was less frequent ($p = 0.038$) in livers with IP than in the others. IP had no influence on apoptosis as assessed by terminal transferase uridyl nick-end labeling (TUNEL) assay or caspase-3, -8 and -9 expression. IP induced a twofold increase in B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2; $p < 0.05$), which was localized to hepatocytes of centrolobular and peliotic areas and colocalized with the autophagy protein beclin-1 in livers with IP, suggesting their coordinated role in autophagy. Increased expression of the phosphorylated Bcl-2 was observed in preconditioned livers and was associated with a decreased immunoprecipitation of beclin-1 and the increased expression of light chain 3 type II (LC3-II). The increased number of autophagic vacuoles seen by electron microscopy confirmed an association of autophagy in chemotherapy-injured livers following IP. However, the differences in protein expression were not reflected in postresection liver-injury tests or measure of patient morbidity.**

***Conclusions*: IP is associated with a reduction in necrosis of hepatocytes already damaged by chemotherapy and an activation of autophagy. Bcl-2 and beclin-1 could be major targets in the regulation of cell death during I/R injury.**

© 2009 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

***Keywords*: Cell death; Ischemia/reperfusion; Ischemic preconditioning; Chemotherapy; Bcl-2; Beclin-1; Autophagy; Liver**

Received 18 February 2009; received in revised form 26 May 2009; accepted 17 June 2009; available online 14 August 2009
Associate Editor: P.-A. Clavien

☆ The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding from industry or conflict of interest with respect to this manuscript.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 45593693; fax: +33 1 45593625.
E-mail addresses: antoinette.lemoine@pbr.aphp.fr, antoinette.lemoine@u-psud.fr (A. Lemoine).
# These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BCIP/NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium; Bcl-2, B-cell leukemia/lymphoma 2; IP, ischemic preconditioning; I/R, ischemia/reperfusion; LC3-II, light chain 3 type II; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; TUNEL, terminal transferase uridyl nick-end labeling.

0168-8278/$36.00 © 2009 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jhep.2009.06.028

Author's personal copy

1. Introduction

Colorectal cancer accounts for about 1 million new cases per year worldwide. At diagnosis, 20% of patients have liver metastases and an additional 35–60% of patients will subsequently develop them. Surgical resection is the best treatment for liver-confined metastases from colorectal cancer [1], and many patients undergo resection of liver metastases after receiving several courses of adjuvant chemotherapy.

It is now established that preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases produces pathologic changes including vascular injury, steatosis, and hepatitis in the nontumorous liver parenchyma, and this liver injury affects surgical outcomes [2–5]. Chemotherapy-induced liver pathology increases both morbidity and mortality [2–3] after liver surgery. It may augment the consequences of ischemia/reperfusion (I/R) injuries during liver surgery, since either steatotic livers or livers with vascular pathology from etiologies other than chemotherapy have been reported to be more sensitive to I/R injuries [4–7].

Ischemic preconditioning (IP), first described in the heart by Murry et al. [8], consists of brief periods of vascular occlusion that confer protection against subsequent I/R injury via an endogenous protective mechanism.

The effectiveness of IP against hepatic I/R injury during human liver surgery has been demonstrated by lower transaminase levels and reduced endothelial cell injury [9]. This protection has been linked to decreased apoptotic cell death [10,11] as well as to preservation of the adenosine triphosphate (ATP) content in liver tissue [9,12–14] or overproduction of B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2), interleukin 1 receptor antagonist, and inducible nitric oxide synthase, countering the proinflammatory and proapoptotic effects of I/R [15].

The beneficial effects of IP in human liver surgery have been demonstrated in specific groups, such as young patients and patients with liver steatosis [9] or cirrhosis [16]. Because chemotherapy causes steatosis and vascular injuries that reduce tolerance to perfusion injury and increase risk of subsequent liver failure, we have assessed whether IP could induce tolerance of chemotherapy-injured liver cells to cell death in a subgroup of patients who all received chemotherapy and underwent the same liver surgery.

2. Patients and methods

2.1. Study population and experimental design

In our institution, a total of 501 patients underwent hepatic resection for colorectal liver metastases from 2001 to 2007. Of those, 61 patients underwent surgery with total vascular occlusion and preservation of the caval flow after receiving several courses of chemotherapy. IP, consisting of 10 min of portal triad clamping followed by 10 min of reperfusion before the prolonged ischemia required by liver resection, was performed in 30 of 61 patients. Notably, 27 of 61 patients had been previously analyzed as part of a previous clinical trial in which patients were randomized to undergo or not undergo IP [17].

For all patients, two liver biopsies were taken, one just prior to IP and another after liver reperfusion (median: 88 min; range: 57–125 min), before closure of the abdomen. Liver biopsies were performed at the free edge of segment 3 in all patients. The biopsies were felt to be deep enough to avoid the known artifacts that result from operative manipulation. All of the IP and the non-IP patients underwent liver biopsy with the same technique. The subgroup of 61 patients underwent protocols of intravenous systemic chemotherapy based on the use of 5-fluorouracil. Most of them also received oxaliplatin and/or irinotecan and/or avastin before surgery (Table 1). The nature of the chemotherapy and the number of courses were distributed similarly in the two groups. There was no significant difference in distribution of age, gender, liver function test values, prothrombin time, and creatinine before surgery between the two groups. The type and number of surgical procedures, the volume of resected liver, and the overall duration of operation were similar between the two groups, as was the time of ischemia, which varied from 15 to 75 min. Informed consent was obtained from each patient included in the study, and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

2.2. Histologic evaluation

Histologic evaluation was carried out without knowledge of the state of IP of the patients and related clinical data. The histologic features, previously assessed at the time of surgery, were reviewed by an experienced pathologist (MS). Briefly, samples were formalin fixed, embedded in paraffin, and stained with standard hematoxylin eosin safran and picrosirius stain. Steatosis was semiquantitatively graded. Fibrosis was assessed using the METAVIR system, as described elsewhere [18], and graded according to severity as portal, portoportal, septal fibrosis, or cirrhosis. Patchy necrosis associated with polymorphonuclear infiltrate was classified as *surgical* necrosis. Vascular lesions included sinusoidal vasodilatation and congestion, hemorrhagic centrolobular necrosis, peliosis, veno-occlusive disease, and regenerative nodular hyperplasia.

2.3. DNA fragmentation

A cell-death terminal transferase uridyl nick-end labeling (TUNEL) kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) was used on 40 liver samples (20 from the IP group and 20 from the non-IP group) according to the manufacturer's protocol. TUNEL assay was evaluated according to Kerr's criteria [19]. Values are the number of apoptotic figures out of 1000 apoptotic and nonapoptotic cells under a light microscope. The results were analyzed by two different pathologists who were not aware of the preconditioning status of the patient biopsies.

2.4. Western blot analysis

For each of the 61 patients, whole protein extracts were prepared from each frozen sample (two per patient), as previously described [15]. The membranes were probed with the following antibodies: mouse monoclonal anti-caspase-3, clone 31A1067; mouse monoclonal anti-caspase-8, clone 12F5 (Alexis Biochemical Corporation, Lausen, Switzerland); rabbit polyclonal anti-caspase-9 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); mouse anti-human-Bcl-2 oncoprotein, clone 124 (DAKO, Glostrup, Denmark); rabbit polyclonal anti-LC3 (MBL, Nagoya, Japan); mouse monoclonal anti-beclin-1, clone 20/Beclin (BD Bioscience, Franklin Lake, NJ, USA); and mouse monoclonal anti-β-actin, clone AC-74 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). After overnight incubation with each primary antibody, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G (DAKO) for 1 h at room temperature. The pro-

Author's personal copy

Table 1
Demographic, surgical, and biologic characteristics of patients undergoing or not undergoing ischemic preconditioning during hepatectomy.

Variable (mean)	Preconditioned ($n = 30$)	Nonpreconditioned ($n = 31$)	p value*
1. Clinical and laboratory			
Age (y)	62 ± 10	64 ± 8	0.40
Sex (male/female)	19/11	16/15	0.35**
AST (IU/L)	40 ± 23	35 ± 23	0.36
ALT (IU/L)	37 ± 15	39 ± 39	0.73
Bilirubin (μmol/L)	12 ± 5	10 ± 3	0.08
Alkaline phosphatase (IU/L)	142 ± 88	132 ± 71	0.63
GGT (IU/L)	117 ± 121	121 ± 137	0.90
PT (%)	91 ± 12	96 ± 6	0.051
Creatinin (μmol/L)	77 ± 16	73 ± 18	0.39
2. Surgical parameters			
Ischemia time (min)	44.0 ± 13.8	45.8 ± 13.6	0.61
Total surgical time (min)	306.8 ± 61.6	332.3 ± 99.5	0.23
Weight of resected liver (g)	513.6 ± 414.8	447.0 ± 271.4	0.46
Number of resected segments	3.4 ± 1.5	2.9 ± 1.4	0.23
Mean blood loss (L)	1.1 ± 0.9	0.8 ± 0.5	0.14
3. Chemotherapy regimen			
5-FU	30	31	
Oxaliplatin	10	9	0.72**
Irinotecan	4	7	0.17***
Oxaliplatin plus irinotecan	9	5	0.12***
Avastin	1	1	0.51***

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, γ-glutamyltransferase; PT, prothrombin time.
* All parameters were compared using the student *t* test, except as indicated.
** Compared using the χ^2 test.
*** Compared using the Fisher exact test.

teins were then detected using an enhanced chemiluminescence western blotting detection system (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Images were captured with a Fuji Film Intelligent Dark Box II coupled to IRLAS-1000 pro V2.5 software (FujiFoto Film Co. Ltd.). The density of the bands was compared using Image Gauge V4.0 software (FujiFoto Film Co. Ltd.). For comparison, the bands were delineated into squares of identical surface area and the intensity of signal was measured. The global background signal was subtracted. Means and standard deviations were calculated for procaspases-3, -8, and -9 and Bcl-2.

2.5. Immunoprecipitation

After normalization for total protein content, the resulting lysates were incubated with a rabbit polyclonal or mouse monoclonal anti-Bcl-2 antibody for 1.5 h at 37 °C and then immunoprecipitated using Protein A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Beads were then washed three times in phosphate buffered saline, and 30 μl of loading buffer was added. Immunoprecipitated proteins were then boiled for 10 min, separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and probed for mouse monoclonal anti-Bcl-2, clone 124, mouse monoclonal anti-beclin-1, and rabbit polyclonal anti-phosphorylated proteins antibodies (Zymed, San Francisco, CA, USA).

2.6. Immunohistologic procedures

Part of the liver sample was available for immunostaining (five preconditioned-liver biopsies and four nonpreconditioned). Immunohistology was performed on 4-μm paraffin-embedded formalin-fixed tissue sections using the anti-Bcl-2 and the anti-beclin-1 antibodies. Antigen retrieval was obtained by heat in a citrate buffer at pH 6 for beclin-1 and in tris–citrate buffer at pH 9 with 0.5% saponine for Bcl-2. The revelation system was based on a three-step biotin-free immunophosphatase stain using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NTB) chromogene substrate (DAKO, Glostrup, Denmark), followed by nuclear red counterstaining.

2.7. Electron microscopy

Electron microscopy was performed, as previously described [20]. Samples taken from segment 3 by surgery were further fragmented for better penetration of the fixative and of the embedding resin, allowing the examination of 80–100 hepatocytes per thin section in at least two to three different embedded fragments per patient.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using R software version 1.8.0. Results are expressed as mean and standard deviation. Means were compared in the different groups with the help of analysis of variance. Student *t* test after normalization of variables was used to compare two means, and the Wilcoxon rank-sum test (nonparametric *U* test) was used when the number of samples was less than 10. For dichotomous variables, a Fisher exact test or χ^2 test with or without Yates correction ($n = 3$) was used.

3. Results

3.1. Histologic and biologic characteristics

Histologic findings of liver biopsies performed before IP and I/R injury were in accordance with previously described responses to chemotherapy (Table 2). A

Author's personal copy

predominance of vascular lesions occurred in 44.3% of the patients, and one patient exhibited veno-occlusive disease. Macrovesicular steatosis was observed in at least 10% of hepatocytes in 32.8% of the patients, and two patients exhibited steatohepatitis with 50% fatty hepatocytes. Six patients had at least portoportal fibrosis. Differences in incidence of steatosis or vascular lesions in livers with IP versus those without were not statistically significant. The liver-injury tests were similar between the IP and the non-IP groups in the preoperative period and exhibited no differences in the postoperative period; this was also the case for the measures of patient morbidity (Table 2).

3.2. Characteristics of cell death in preconditioned and nonpreconditioned livers after ischemia/reperfusion injury

3.2.1. Necrotic cell death

After I/R injury, a patchy centrolobular necrosis with polymorphonuclear infiltrate was more often encountered in non-IP patients (8 of 31) than in IP patients (2 of 30) ($p = 0.038$; Table 2). All necrotic cells were located in the centrolobular areas, and none were in the peliotic areas. An example is shown in Fig. 1.

3.2.2. Apoptotic cell death

After I/R injury, apoptosis, assessed by TUNEL assay (Table 2) was similar in livers with and without IP. A mean of 21 and 29 apoptotic hepatocytes per 1000 cells was observed at the centrolobular region in non-IP and IP livers, respectively, although high variability among patients was observed. Apoptotic smaller cells were also observed close to blood vessels (a mean of 10 and 13 apoptotic cells per 1000 cells in non-IP and IP livers, respectively), thereby raising the issue of whether they are hepatocytes or endothelial cells. We assessed by immunoblot the cleavage of three major caspases—caspases-3, -8, and -9—and the level of Bcl-2. IP was not associated with changes in cleavage of caspases-3, -8, and -9, although it seemed to avoid the decrease of procaspase-3 due to I/R injury that was observed in non-IP livers. By contrast, we observed a significant twofold increase in the level of Bcl-2 in the livers of patients who underwent IP ($p < 0.05$; Fig. 2).

The distribution of Bcl-2 in chemotherapy-injured livers was examined by immunohistochemistry on liver sections before and after I/R injury in a subset of patients who underwent IP and compared to those who did not. Before I/R injury, Bcl-2 was expressed in

Table 2
Histologic, biologic, and clinical data in 61 patients formerly treated by chemotherapy and undergoing or not undergoing ischemic preconditioning during hepatectomy.

Histologic features	Preconditioned ($n = 30$)	Nonpreconditioned ($n = 31$)	p Value
Before surgery			
Steatosis >10%[a]	12	8	0.24
Fibrosis[a]	2	4	0.25
Vascular lesions[a]	13	14	0.89
Sinusoidal dilatation	2	2	0.39
Peliosis	6	4	0.21
NRH	4	6	0.22
Peliosis plus NRH	1	0	0.49
Veno-occlusive disease	0	2*	0.25
After surgery			
Surgical necrosis[a]	2	8	0.038
Apoptosis	–	–	–
Sinusoidal cells (mean ± SD per 1000 cells)	13.8 ± 6.3	10.4 ± 14.5	0.32
Hepatocytes (mean ± SD per 1000 cells)	29.8 ± 11.2	21.4 ± 31.9	0.26
Hepatic functionality after 7 d postsurgery (mean ± SD)			
AST (IU/L)	59 ± 27	49 ± 29	0.17
ALT (IU/L)	116 ± 70	142 ± 128	0.32
Bilirubin (μmol/L)	65 ± 106	31 ± 42	0.10
Alkaline phosphatase (IU/L)	200 ± 114	296 ± 118	0.002
GGT (IU/L)	280 ± 196	290 ± 249	0.87
PT (%)	78 ± 14	82 ± 13	0.28
Duration of hospitalization			
Intensive care unit stay	2.47 ± 1.18	2.15 ± 2.64	0.55
Total stay in hospital	14.00 ± 5.16	17.13 ± 10.00	0.13

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, γ-glutamyltransferase; NRH, nodular regenerative hyperplasia; PT, prothrombin time; SD, standard deviation.

[a] Values shown represent the number of subjects within a category with the mentioned histologic features.

* One subject also exhibited histologic features of NRH.

Author's personal copy

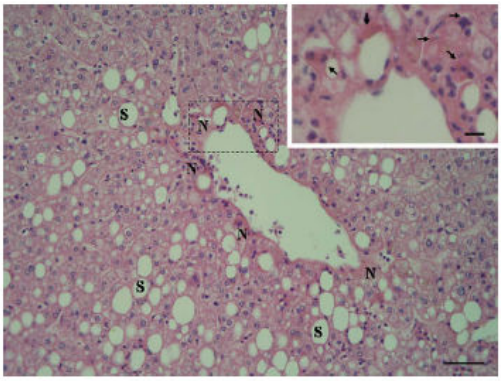


Fig. 1. Necrotic cell death in liver without ischemic preconditioning. Patchy centrolobular necrosis (*N*) is indicated within the dashed lines in a chemotherapy-injured liver after ischemia/reperfusion injury. The polymorphonuclear infiltrate and necrotic hepatocytes (arrows) are shown enlarged in the inset (×400; bar = 25 μm). Steatotic hepatocytes (*S*) are also shown (×100; bar = 200 μm).

infiltrating lymphocytes and small biliary ducts. After I/R injury, Bcl-2 was expressed in hepatocytes of three of the five IP patients analyzed; it was rare and mainly localized in centrolobular and peripeliotic hepatocytes (Fig. 3A). Although several steatotic cells in the centrolobular areas expressed Bcl-2, not all steatotic hepatocytes expressed Bcl-2. In contrast, no hepatocyte expression of Bcl-2 was observed in the cases of patients in the non-IP group.

3.3. Study of the activation of autophagy as a survival mechanism induced by ischemic preconditioning

Because Bcl-2 acts not only as an antiapoptotic protein but also as an antiautophagy protein via its inhibitory interaction with beclin-1 [21], we analyzed the expression of beclin-1 on consecutive liver sections from the IP and non-IP patients evaluated for Bcl-2. Interestingly, rare cytosolic or perinuclear expression of beclin-1 was observed only in livers with IP and not in livers without IP after I/R injury. Moreover, beclin-1 colocalized with Bcl-2 in peripeliotic and centrolobular hepatocytes (Fig. 3B). Coimmunoprecipitation experiments using Bcl-2 antibodies showed an increased expression of the phosphorylated fraction of Bcl-2 in protein lysates from livers with IP together with a decreased expression of beclin-1, thereby suggesting that the Bcl-2/beclin-1 complex was partly dissociated in livers with IP following I/R injury (Fig. 4). In contrast, the expression levels of both Bcl-2 and beclin-1 remained similar in livers without IP before and after I/R injury. Interestingly, we detected an increase in light chain 3 type II (LC3-II) expression following I/R injury in 80% of the livers from the IP

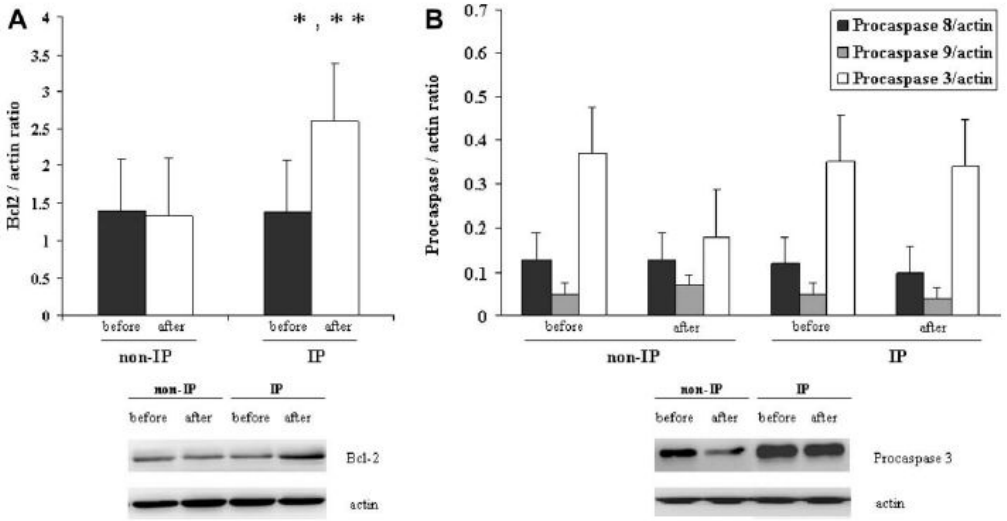


Fig. 2. Effects of ischemic preconditioning (IP) on B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) and caspases expression assessed by western blot analysis in livers of patients previously treated by chemotherapy. β-Actin was assessed as a control for loading and transfer. (A) Before: biopsy performed before ischemia/reperfusion injury (I/R); After: biopsy performed after I/R. *$p < 0.05$ compared to the expression of the protein in the control biopsy before I/R. **$p < 0.05$ compared to the expression of the protein in the biopsy taken after I/R in the non-IP group. (B) As cleaved (activated) caspases were only weakly detectable in most liver biopsies, procaspase levels were used for quantification. A representative western blot analysis of Bcl-2 and procaspase-3 in two patients' livers, one non-IP and one IP, is also shown.

Author's personal copy

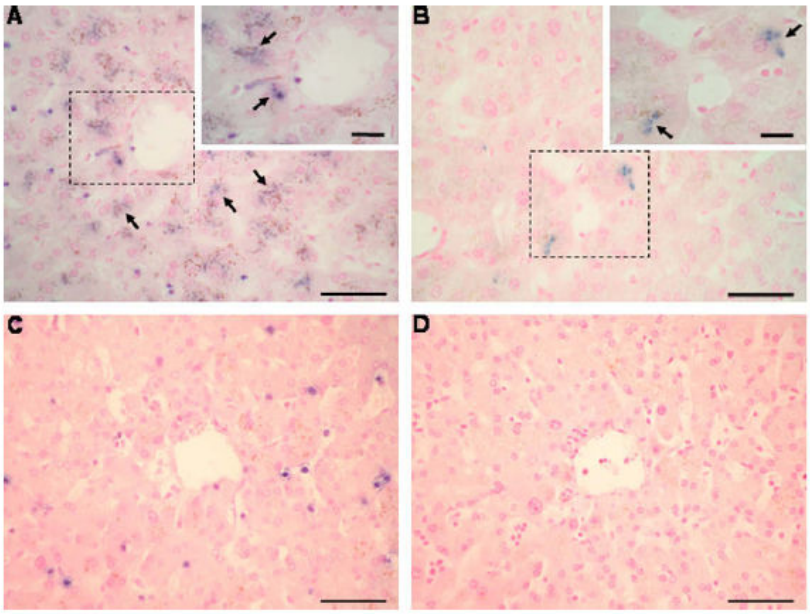


Fig. 3. Assessment of B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) and beclin-1 expressions in livers with and without ischemic preconditioning (IP) from patients treated by chemotherapy. (A) Bcl-2 expression in the hepatocytes of a patient's preconditioned liver in a centrolobular region (arrows) (×400; bar = 50 μm). Hepatocytes expressing Bcl-2 circumscribed within the dashed lines are shown enlarged in the inset (×1000; bar = 10 μm). (B) Beclin-1 expression in the hepatocytes of the same patient in a centrolobular region (arrows) (×400; bar = 50 μm). Hepatocytes expressing beclin-1 circumscribed within the dashed lines are shown enlarged in the inset (×1000; bar = 10 μm). (C) Bcl-2 is not expressed in the hepatocytes of a patient's nonpreconditioned liver (×400; bar = 50 μm). The blue staining corresponds to lymphocytes infiltrated in the liver parenchyma. (D) Beclin-1 is not expressed in the liver of the same patient (×400; bar = 50 μm).

group but in only 13% of livers from the non-IP group, although low levels of LC3-II were observed in all the livers before I/R injury (Fig. 4).

Finally, electron microscopy was performed on liver biopsies of five patients before IP or I/R and after I/R injury. Four of the five patients had been treated by chemotherapy (two underwent IP and two did not), and one patient who underwent surgery on a completely normal liver, operated for a hydatid cyst, underwent IP. Prior to I/R injury, autophagy-positive cells were less than 10% of counted cells (80–100 cells per biopsy) in biopsies for both the IP and non-IP groups. Within the autophagy-positive cells, the average number of vacuoles was similar (1.89 ± 1.11 in the IP group vs. 1.45 ± 0.80 in the non-IP group). Interestingly, after I/R injury, the number of autophagy-positive cells was fixed at less than 10% in biopsies of the non-IP group, while a clear-cut increase was observed in biopsies for the IP group, with 50% or 60% of autophagy-positive hepatocytes observed respectively in the two patients. Furthermore, after I/R injury, in autophagy-positive cells, the number of autophagic vacuoles observed in biopsies for the IP group was greater than that observed in biopsies for the non-IP group (10.6 ± 8.07 vacuoles per cell in the IP group vs 3.6 ± 3.2 vacuoles per cell in the non-IP group; $p < 0.001$; Fig. 5) as well as in the normal liver (data not shown). These results suggest that autophagy could be induced in response to IP in chemotherapy-injured livers.

4. Discussion

IP has been reported to confer protection against subsequent I/R injury in an endogenous protective mechanism. Although the molecular pathways affected by IP in human liver surgery have not been well characterized, IP appears to confer tolerance to I/R injuries in steatotic [9] and cirrhotic livers [16]. In a previous study [17], we could not demonstrate any beneficial effect of IP by analyzing transaminases or clinical outcome after resection of a cohort of 60 patients, including 27 patients with colorectal cancers treated by chemotherapy. In this study, our objective was to assess whether IP could change the patterns of cell death resulting from I/R in human livers previously altered by several courses of chemotherapy. A decrease in necrotic cell death and

Author's personal copy

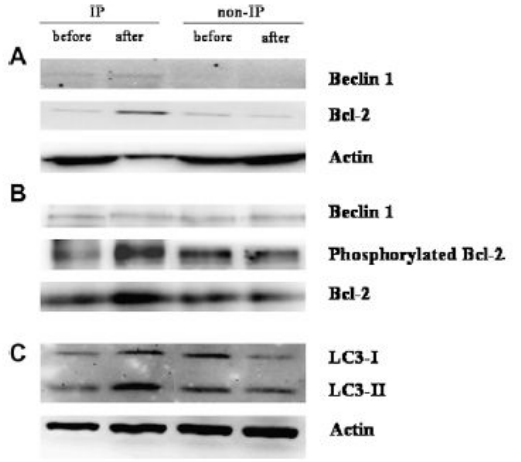


Fig. 4. Effects of ischemic preconditioning (IP) on the expression and phosphorylation of B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) and its correlation with expression of autophagy markers. Representative results from livers with and without IP are shown before and after ischemia/reperfusion injury (I/R). (A) Levels of Bcl-2 and beclin-1 assessed by western blot analysis. (B) Coimmunoprecipitation of Bcl-2 and beclin-1. Levels of phosphorylated Bcl-2 are also shown. (C) Levels of light chain 3 (LC3) as assessed by western blot analysis. β-Actin was assessed as a control for loading and transfer in western blot.

the appearance of autophagic vacuoles were observed in livers undergoing IP compared to non-IP livers, while no change in apoptosis was observed between the two groups of patients. These changes, however, were not associated with differences in postresection liver-injury tests or patient morbidity.

Chemotherapy has been reported to induce liver parenchyma injuries such as steatosis, steatohepatitis, and vascular lesions [2–5]. Concordant with these findings, we observed greater than 10% steatotic hepatocytes in 32.8% of the patients and vascular lesions in 44.3%; only one patient had a completely normal liver parenchyma. Anticancer drugs have also been described to induce autophagy [22,23], an observation that could explain the low levels of autophagic vacuoles, as assessed by transmission electron microscopy, that we observed in liver biopsies before IP or I/R.

Cell death occurs following I/R, which results in reduced function of the organ. Results obtained under warm ischemia indicate that apoptosis is the predominant form of hepatocyte death in the ischemic nonsteatotic liver, whereas the steatotic livers develop massive necrosis after an ischemic insult [24]. In our study, we observed patchy areas of centrolobular necrosis with polymorphonuclear infiltrate following I/R injury that were significantly less frequent after IP. No change in apoptotic cell numbers or caspase-3, -8, and -9 cleavage was found between livers with and without IP, as previously reported [16,25,26], although there was a trend for a decrease in procaspase-3 expression linked to I/R injury.

We observed that the protection against I/R injury conferred by IP is related to a major increase in Bcl-2 expression. Our observation corroborates the importance of Bcl-2 in IP [27,28] and confirms our previous results [15]. Although not constitutively expressed in normal livers [29], as we have also observed in our study, Bcl-2 can be rapidly upregulated after inflammatory stress such as cholestasis [30] and endotoxic shock [31]. It is also possible that the protective role of the increased expression of Bcl-2 by IP is to maintain higher intracellular levels of ATP [32,33], which are known to be decreased in fatty livers [34].

Recent studies suggest that Bcl-2 can have a dual function, by turning autophagy or apoptosis on or off when required, and that autophagic cell death may be observed under conditions in which apoptosis is blocked [21]. The increase in Bcl-2, especially in areas damaged by chemotherapy, and its colocalization with beclin-1, which we observed in livers with IP, may regulate autophagy to protect against I/R injury. Immunoprecipitation studies that we carried out showed an increased phosphorylation of Bcl-2 in the IP group that could disrupt the Bcl-2/beclin-1 complex leading to the activation of autophagy, as attested by the increased levels of LC3-II expression and the increased numbers of autophagic vacuoles. Indeed, phosphorylation of Bcl-2 has been recently proposed as a promoting event in chemically induced autophagy [35]. The observed expression of LC3-II and the numerous autophagic vacuoles in the cytoplasm of liver cells following IP suggest an association of autophagy with IP. The increased presence of autophagosomes with digested materials in preconditioned livers may imply a rescuing function of autophagy in injured livers. In our model, IP may trigger autophagic pathways by the activation of beclin-1 expression in cells with nonactivated caspase-3, as previously described [36]. Therefore, autophagy could be activated to temporarily avoid cell death by necrosis and its subsequent inflammatory process.

In conclusion, IP appears to change cell death pattern in chemotherapy-injured livers submitted to hepatocellular damage induced by I/R associated with liver resection. Increased autophagy observed in livers with IP could be involved in temporarily limiting cell death induction by necrosis in injured livers. Increase in Bcl-2, especially in zones damaged by chemotherapy, collocated with beclin-1 and the phosphorylation of Bcl-2 suggest an important role for these proteins in the regulation of cell death during IP. Further studies are warranted to assess whether activation of autophagy could have clinical relevance in IP.

Author's personal copy

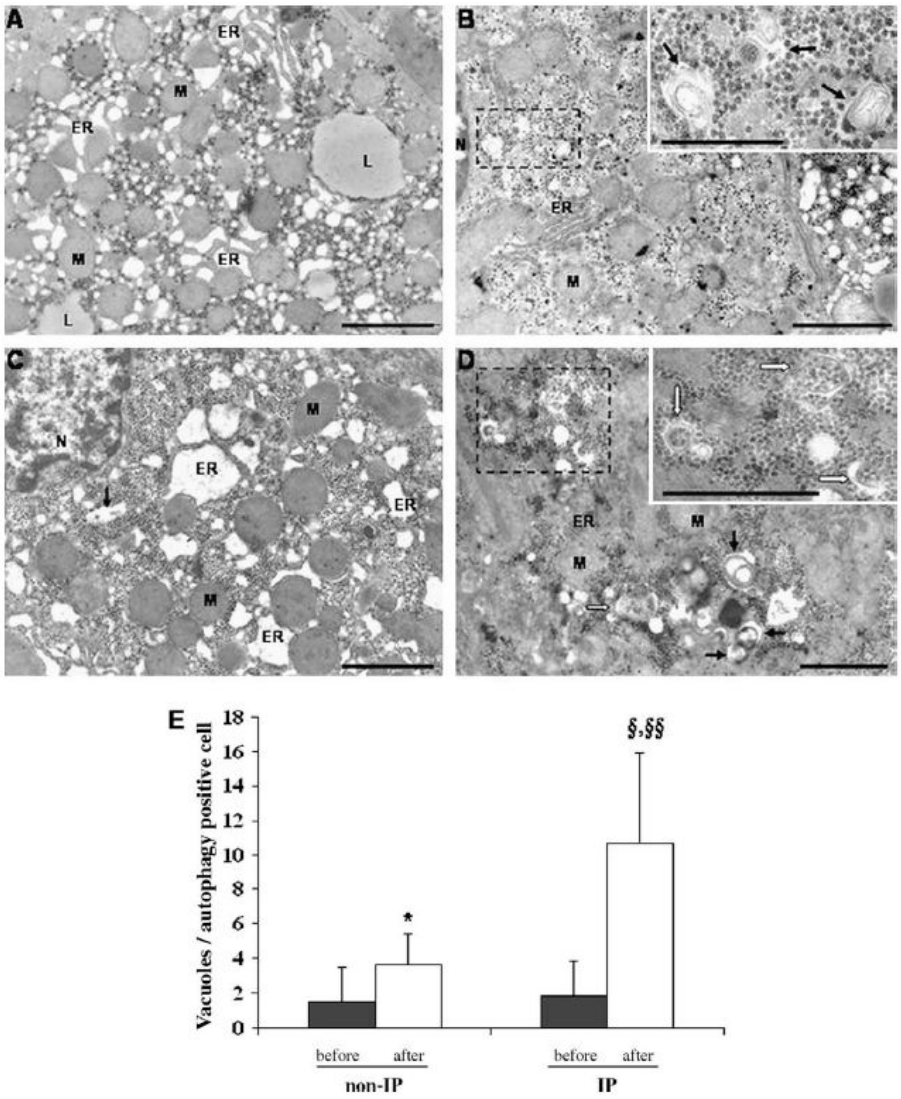


Fig. 5. Ultrastructure of autophagic vacuoles in livers with and without ischemic preconditioning (IP) from patients treated by chemotherapy. (A) Representative field of a hepatocyte from a non-IP patient before ischemia/reperfusion injury (I/R). A cytoplasmic area from a hepatocyte with conspicuous dilation of the endoplasmic reticulum (ER) is shown. Bar = 2 μm. (B) Biopsy from the same patient after I/R. Notice that adjacent hepatocytes present different conformations of the ER: tight on the left cell and dilated on the right. A few presumptive autophagic vacuoles circumscribed within the dashed lines are shown enlarged in the inset. This reveals endogeneous membranous whorls indicative of autophagolysosomes (black arrows). Bar = 2 μm. Inset bar = 500 nm. (C) Representative field of a liver biopsy from an IP patient before I/R. Dilatation of the ER of the hepatocyte is striking. Other cell organelles like mitochondria or the nucleus are not altered. Black arrow underlines a single autophagolysosome. Bar = 2 μm. (D) Biopsy from the same patient after I/R. Cytoplasmic area of a hepatocyte showing a nondilated ER and a high number of autophagic vacuoles (black and white arrows). A cluster of autophagic vacuoles delineated by dashed lines is enlarged in the inset. Higher magnification allows to distinguish newly formed autophagosomes (white arrows) from neighboring autophagolysosomes (black arrows). Bar = 2 μm. Inset bar = 1 μm. (E) Number of autophagic vacuoles counted in autophagy-positive hepatocytes by electron microscopy in four patients formerly treated by chemotherapy and undergoing ischemic preconditioning or not during hepatectomy. The frequency of autophagy-positive hepatocytes was 10% in non-IP patients, both before and after I/R, while in IP patients, it increased from 10% before I/R to 50–60% after I/R. *Statistically significant, comparing the number of vacuoles before and after surgery in non-IP patients, using the student *t* test, $p = 0.0017$. §Statistically significant, comparing the number of vacuoles before and after surgery in IP patients, using the student *t* test, $p = 1.45 \times 10^{-6}$. §§Statistically significant, comparing the number of vacuoles after surgery between non-IP and IP patients, using the student *t* test, $p = 7.6 \times 10^{-13}$. *Abbreviations:* L, lipid droplet; M, mitochondrion; N, nucleus; PM, plasma membrane.

Author's personal copy

Acknowledgments

Marie-Charlotte Domart is a fellow of Ligue Nationale Contre le Cancer (comité de l'Essonne). Davide Degli Esposti is a fellow of NRB-Vaincre le Cancer and Groupement Coopératif de Transplantation de l'Ile de France. Natalia Olaya was supported by a grant from Colciencias (Colombia).

References

[1] Saltz L, Kelsen D. Adjuvant treatment of colorectal cancer. Annu Rev Med 1997;48:191–202.
[2] Zorzi D, Laurent A, Pawlik TM, Lauwers GY, Vauthey JN, Abdalla EK. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. Br J Surg 2007;94:274–286.
[3] Karoui M, Penna C, Amin-Hashem M, Mitry E, Benoist S, Franc B, et al. Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. Ann Surg 2006;243:1–7.
[4] Aloia T, Sebagh M, Plasse M, Karam V, Levi F, Giacchetti S, et al. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. J Clin Oncol 2006;24:4983–4990.
[5] Fernandez FG, Ritter J, Goodwin JW, Linehan DC, Hawkins WG, Strasberg SM. Effect of steatohepatitis associated with irinotecan or oxaliplatin pretreatment on resectability of hepatic colorectal metastases. J Am Coll Surg 2005;6:845–853.
[6] El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. Hepatology 2007;45:855–863.
[7] Behms KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. J Gastrointest Surg 1998;2:292–298.
[8] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia preconditioning: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124–1136.
[9] Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg 2003;238:843–850.
[10] Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Gastroenterology 2003;125:1480–1491.
[11] Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. Gastroenterology 2003;125:1246–1257.
[12] Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. Dig Surg 2003;20:383–396.
[13] Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia–reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. Hepatology 1997;4:934–937.
[14] Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. J Hepatol 2003;39:55–61.
[15] Barrier A, Olaya N, Chiappini F, Roser F, Scatton O, Artus C, et al. Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia–reperfusion. FASEB J 2005;19:1617–1626.
[16] Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. World J Gastroenterol 2004;10:2580–2584.
[17] Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. J Am Coll Surg 2006;202:203–211.
[18] Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. Hepatology 1996;24:289–293.
[19] Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;6:239–257.
[20] Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. J Biophys Biochem Cytol 1961;9:409–414.
[21] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:741–752.
[22] Benzina S, Altmeyer A, Malek F, Dufour P, Denis JM, Gueulette J, et al. High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells. Cancer Lett 2008;264:63–70.
[23] von Bültzingslöwen I, Jontell M, Hurst P, Nannamark U, Kardos T. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. Oral Oncol 2001;37:537–544.
[24] Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. Hepatology 2000;32:1280–1288.
[25] Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. Hepatology 1999;30:1223–1231.
[26] Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. Ann Surg 2000;232:155–162.
[27] Lacronique V, Mignon A, Fabre M, Viollet B, Rouquet N, Molina T, et al. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. Nat Med 1996;2:80–86.
[28] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S. Role of Bcl-2 family proteins in a non apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat Cell Biol 2004;6:1221–1228.
[29] Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M, Gaulard P, et al. Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein in normal and pathological human liver. Am J Pathol 1994;144:460–465.
[30] Kurosawa H, Que FG, Roberts LR, Fesmier PG, Gores GJ. Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2. Am J Physiol 1997;272:G1587–G1593.
[31] Haendeler J, Messmer UK, Brune B, Neugebauer E, Dimmeler S. Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. Shock 1996;6:405–409.
[32] Belzacq AS, Vieira HL, Verrier F, Vandecasteele G, Cohen I, Prévost MC, et al. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. Cancer Res 2003;63:541–546.
[33] Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. Cell Death Differ 2007;14:1617–1627.
[34] Yamabe K, Shimizu S, Kamiike W, Waguri S, Eguchi Y, Hasegawa J, et al. Prevention of hypoxic liver cell necrosis by in vivo human bcl-2 gene transfection. Biochem Biophys Res Commun 1998;243:217–223.
[35] Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. J Biol Chem 2009;284:2719–2728.
[36] Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, et al. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. Autophagy 2008;4:435–441.

AUTOPHAGIC PUNCTUM

Autophagy 6:1, 1-3; January 1, 2010; © 2010 Landes Bioscience

This manuscript has been published online, prior to printing. Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis

Davide Degli Esposti,[1-3,†] Marie-Charlotte Domart,[1,2,†] Mylène Sebagh,[4] Francis Harper,[5] Gérard Pierron,[5] Catherine Brenner[6] and Antoinette Lemoine[1-3,*]

[†]These authors contributed equally to this work.

[1]AP-HP; Hôpital Paul Brousse; Service de Biochimie et Biologie Moléculaire; Villejuif, France; [2]Inserm U602; Institut André Lwoff-IFR89; Université Paris XI; PRES Universud-Paris; Villejuif, France; [3]Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire; Faculté de Pharmacie; Châtenay-Malabry, France; [4]AP-HP; Hôpital Paul Brousse; Service d'Anatomie Pathologique; Inserm U785; Université Paris XI; Institut André Lwoff; Villejuif, France; [5]Institut André Lwoff; UPR-1983; Laboratoire Réplication de l'ADN et Ultrastructure du Noyau; Villejuif, France; [6]CNRS UMR 8159; Université Versailles/St Quentin; PRES Universud-Paris; Versailles, France

The effectiveness of ischemic preconditioning (IP) against hepatic ischemia/reperfusion injury during human liver surgery is linked to decreased apoptotic cell death as well as preservation of the ATP content in liver tissue. Overproduction of Bcl-2 is reported in preconditioned organs. In human liver biopsies exhibiting steatosis and/or vascular injuries (mainly peliosis) induced by chemotherapy, we find that the expression of Bcl-2 in centrolobular and peliotic areas colocalizes with the autophagy protein Beclin 1 in IP livers. Increased expression of phosphorylated Bcl-2 in preconditioned livers is associated with decreased immunoprecipitation of Beclin 1 and increased expression of LC3-II. The increased number of autophagic vacuoles seen by electron microscopy confirmed that IP could trigger autophagy in chemotherapy-injured livers, probably to reduce the pro-inflammatory necrotic cell death of hepatocytes or endothelial cells and to increase ATP levels. Indeed, necrosis is less frequent ($p = 0.04$) in IP livers than in the others although no change in apoptosis as assessed by TUNEL assay or caspase-3, -8 and -9 expressions is observed. In conclusion, Bcl-2 and Beclin 1 could be major targets in the regulation of cell death during ischemia/reperfusion injury modulating autophagy to switch on/off necrosis and/or apoptosis.

Key words: cell death, ischemia/reperfusion, ischemic preconditioning, chemotherapy, Bcl-2, Beclin 1, autophagy, liver

Abbreviations: IP, ischemic preconditioning

Submitted: 11/06/09

Revised: 11/16/09

Accepted: 11/18/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/10699

*Correspondence to: Antoinette Lemoine; Email: antoinette.lemoine@pbr.aphp.fr; antoinette.lemoine@u-psud.fr

Punctum to: Domart MC, Esposti DD, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G, Franc B, Tanabe KK, Debuire B, Azoulay D, Brenner C, Lemoine A. Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. J Hepatol 2009; 51:881–9; PMID: 19765849; DOI: 10.1016/j.jhep.2009.06.028.

Introduction

Pre-operative chemotherapy for colorectal liver metastases produces pathological changes including vascular injury, steatosis and hepatitis in the nontumorous liver parenchyma, and this liver injury increases both morbidity and mortality after liver surgery. Chemotherapy may augment the consequences of ischemia/reperfusion injuries during liver surgery, since either steatotic livers or livers with vascular pathology from etiologies other than chemotherapy are more sensitive to ischemia/reperfusion injuries.

Ischemic preconditioning (IP) consists of brief periods of vascular occlusion, which confer protection against subsequent ischemia/reperfusion injury via an endogenous protective mechanism. This protection is linked to decreased apoptotic cell death, preservation of the ATP content in liver tissue, and/or the overproduction of anti-apoptotic and anti-inflammatory proteins. We have assessed whether IP could induce tolerance of chemotherapy-injured liver cells to cell death in patients who all received chemotherapy and underwent hepatectomy.

Results

Characteristics of cell death in IP and non-IP livers after ischemia/reperfusion injury. *Necrotic cell death.* After ischemia/

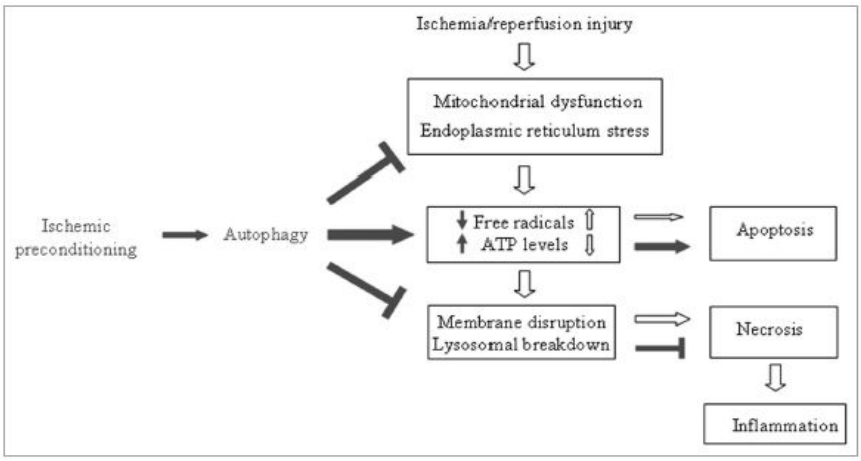


Figure 1. Biological hypothesis: ischemic preconditioning may start up autophagy to keep ATP levels and avoid necrosis. Hollow flashes indicate the necrotic death pathway following ischemia/reperfusion injury. Gray flashes indicate the effect of ischemic preconditioning on cell death pattern, with induction of autophagy and its presumable necrosis delaying/pro-apoptotic and anti-inflammatory effects.

reperfusion injury, a patchy centrolobular necrosis with polymorphonuclear infiltrate was more often encountered in non-IP patients (8/31) than in IP patients (2/30) ($p = 0.038$).

Apoptotic cell death. After ischemia/reperfusion injury, apoptosis, assessed by TUNEL assay, is similar in IP and non-IP livers. A mean of 21 or 29 apoptotic hepatocytes per 1,000 cells is observed at the centrolobular region in non-IP or IP livers, respectively. IP is not associated with changes in cleavage of caspases-3, -8 and -9, although it seems to avoid the decrease of pro-caspase-3 due to ischemia/reperfusion injury that is observed in non-IP livers. We observe a significant two-fold increase in the level of Bcl-2 in the livers of IP patients ($p < 0.05$).

Before ischemia/reperfusion, Bcl-2 is expressed in infiltrating lymphocytes and small biliary ducts. After ischemia/reperfusion, Bcl-2 is expressed exclusively in hepatocytes of IP patients. No hepatocyte expression of Bcl-2 is observed in non-IP patients.

Study of the activation of autophagy as a survival mechanism induced by IP. Immunostaining of Beclin 1 on consecutive liver sections from the IP and non-IP patients evaluated for Bcl-2 shows rare expression of Beclin 1 only in IP livers after ischemia/reperfusion. Interestingly, Beclin 1 colocalizes with Bcl-2 in periportal and centrolobular hepatocytes. Co-immunoprecipitation using Bcl-2 antibodies shows an increased expression of the phosphorylated fraction of Bcl-2 in protein lysates from IP livers together with a decreased expression of Beclin 1, suggesting that the Bcl-2-Beclin 1 complex is partly dissociated in IP livers following ischemia/reperfusion. Although low levels of LC3-II are observed in all the livers before ischemia/reperfusion injury, we detect an increase in LC3-II expression following ischemia/reperfusion in 80% of the IP livers compared to 13% of the non-IP livers.

Finally, electron microscopy was performed on liver biopsies of 4 patients treated by chemotherapy (2 underwent IP and 2 did not) before IP or ischemia/reperfusion, and after ischemia/reperfusion injury. A clear-cut increase of autophagy-positive cells is seen in IP biopsies. Indeed, prior to ischemia/reperfusion, autophagy-positive cells are less than 10% of counted cells (80–100 cells/biopsy). After ischemia/reperfusion injury, the number of autophagy-positive cells does not change in non-IP biopsies, while it increases up to 60% in IP patients. Furthermore, after ischemia/reperfusion injury, the number of autophagic vacuoles in autophagy-positive cells is greater in IP patients compared to non-IP biopsies (10.6 ± 8.07 vacuoles/cell versus 3.6 ± 3.2 vacuoles/cell $p < 0.001$). These results suggest that autophagy could be induced in response to IP in chemotherapy-injured livers.

Discussion

Ischemic preconditioning is reported to confer organ protection against subsequent ischemia/reperfusion injury in an endogenous protective mechanism, especially in steatotic livers. We observe that the protection against ischemia/reperfusion injury conferred by IP can be related to a major increase in Bcl-2 expression. It is also possible that the protective role of the increased expression of Bcl-2 by IP is to maintain higher intracellular levels of ATP, typically decreased in fatty livers, by preserving mitochondrial integrity.

Furthermore, Bcl-2 can have a dual function, by turning autophagy or apoptosis on or off when required, and autophagic cell death may be observed under conditions in which apoptosis is blocked. The increase in Bcl-2, especially in areas damaged by chemotherapy, and its colocalization with Beclin 1 that we observed in IP livers, may regulate autophagy to protect against ischemia/reperfusion injury. Immunoprecipitation studies that we carried out show an increased phosphorylation of Bcl-2 in IP livers that can disrupt the Bcl-2-Beclin 1 complex leading to the activation of autophagy, as attested to by the increased levels of LC3-II expression and the increased numbers of autophagic vacuoles. The increased presence of autophagosomes with digested materials in preconditioned livers may imply a rescuing function of autophagy in injured livers. In our model, IP may trigger

autophagic pathways by the activation of Beclin 1 expression in cells with nonactivated caspase-3. Therefore, autophagy could be triggered by IP to temporarily avoid cell death by necrosis and its subsequent inflammatory process.

In conclusion, IP appears to change the cell death pattern in chemotherapy-injured livers submitted to hepatocellular damage induced by ischemia/reperfusion. Increased autophagy observed in IP livers can be involved in temporarily limiting cell death induction by necrosis in injured livers: an hypothetical schema is shown in **Figure 1**. Increases in Bcl-2, especially in zones damaged by chemotherapy, colocated with Beclin 1 and the phosphorylation of Bcl-2 suggest an important role for these proteins in the regulation of cell death during IP. Further studies are warranted to assess whether activation of autophagy could have a clinical revelance in IP.

Patients and Methods

Sixty-one patients underwent surgery after receiving several courses of chemotherapy. IP, consisting of 10 minutes of portal triad clamping followed by 10 minutes of reperfusion before the prolonged ischemia required by liver resection, was performed in 30 out of a total of 61 (30/61) patients. For all patients, two liver biopsies were taken, one just prior to IP and another after liver reperfusion. The 61 patients underwent protocols of intravenous systemic chemotherapy based on the use of 5-fluorouracil, oxaliplatin and/or irinotecan. There was no significant difference in demographic, clinical, surgical and anatomopathological features between the two groups of patients. Histological evaluation, immunohistochemical analysis, western blot, immunoprecipitation and electron microscopy studies were performed as reported in the original paper.

Acknowledgements

Marie-Charlotte Domart is a fellow of Ligue Nationale Contre le Cancer (comité de l'Essonne); Davide Degli Esposti is a fellow of NRB-Vaincre le Cancer and Groupement Coopératif de Transplantation de l'Ile de France.

©2010 Landes Bioscience.
Do not distribute.

I-2. Etude des mécanismes de tolérance induits par le préconditionnement ischémique chez le donneur de greffons stéatosiques pour transplantation hépatique

Article 3: Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes

Degli Esposti D, Sebagh M, Pham P, Reffas M, Poüs C, Brenner C, Azoulay D, Lemoine A.
Cell Death and Disease, 2011; 2(1):e111

Situation du sujet

Afin de palier la pénurie de greffons à transplanter, les greffons stéatosiques sont utilisés alors qu'ils sont plus sensibles aux lésions d'I/R. Ils sont à l'origine du non fonctionnement primaire du greffon (Adam et al, 1991 ; Canelo et al 1999, Frongillo et al 2009) et plus généralement des dysfonctions du greffon entrainant des suites opératoires plus longues et plus difficiles pour les receveurs. Les bénéfices du préconditionnement ischémique (PI) dans le contexte de la transplantation hépatique des foies marginaux restent controversés. En effet, à ce jour peu d'études ont permis d'évaluer le PI chez l'homme. Notre équipe a montré que celui-ci diminuait les concentrations de transaminases, mais diminuait en même temps la fonction initiale du greffon (Azoulay et al Ann Surg 2005). Jassem et al ont observé une diminution des transaminases chez les receveurs d'un greffon préconditionné (2006), tandis que Koneru et al ont trouvé des pics des transaminases plus élevés dans les foies préconditionnés (2007). Récemment, Franchello et al ont montré que le PI apporte plus des bénéfices aux greffons marginaux (donneurs ayant plus de 60 ans) qu'aux greffons non marginaux (2009) C'est pourquoi nous avons étudié les conséquences d'un PI sur la tolérance des lésions d'ischémie/reperfusion de foies stéatosiques par rapport à des foies non stéatosiques. Dans ce but, nous avons étudié une série de greffons randomisés pour le PI chez le donneur, la moitié d'entre eux étant des foies stéatosiques. Les foies stéatosiques présentaient une stéatose macro-microvésiculaire, soumis à une ischémie froide et à une préservation au cours de la transplantation. Nous avons étudié les conséquences sur la mort cellulaire du greffon après reperfusion et les conséquences post-opératoires cliniques chez le receveur. Comme nous avions précédemment montré une activation de l'autophagie après PI dans des foies stéatosiques et péliotiques, nous avons analysé l'expression de marqueurs de l'autophagie

dans des biopsies des greffons après reperfusion afin d'évaluer si l'autophagie est un mécanisme également activé au cours de la transplantation.

Nous avons analysé une série des biopsies de greffons stéatosiques (n=22) ou non-stéatosiques (n=28), préconditionnés (14 non stéatosiques et 12 stéatosiques) ou non (14 non stéatosiques et 10 stéatosiques).

Résultats et discussion

Comme il est décrit dans la littérature, nous avons observé qu'après reperfusion, les greffons stéatosiques présentent plus fréquemment de la nécrose que les greffons non stéatosiques, associée à des valeurs de transaminases sériques plus élevées que les receveurs de greffons non stéatosiques, malgré une forte variabilité interindividuelle (Behrns et al 1998, El-Badry et al 2007). Chez les receveurs de greffons stéatosiques, le PI diminue la présence de la nécrose, bien qu'aucune diminution des concentrations de transaminases n'ait été observée chez les receveurs de greffons préconditionnés par rapport aux receveurs de greffons non-préconditionnés. Chez les receveurs de greffons non stéatosiques, le PI ne modifie pas la présence de nécrose après reperfusion, mais diminue les concentrations de transaminases sériques chez les receveurs de greffons préconditionnés. L'analyse des paramètres per-opératoires et des suites post-opératoires n'ont pas permis d'obtenir des résultats significativement différents, probablement liée à des variations inter-individuelles très importantes chez les receveurs de greffons stéatosiques.

De façon intéressante, le PI diminue l'incidence des épisodes de rejet léger, aigu ou chronique, seulement chez les receveurs des greffons stéatosiques (aucun épisode de rejet sévère n'a été observé dans notre cohorte de patients).

Nos résultats suggèrent que le PI peut être bénéfique, tant pour les receveurs des foies non stéatosiques que pour les receveurs des foies stéatosiques. Cependant, les mécanismes biologiques diffèrent entre les deux types de greffons. En effet chez les receveurs des greffons stéatosiques, le PI tend à réduire la présence de nécrose et l'incidence des épisodes de rejet aigu et chronique. Il est possible que cet effet soit associé à la présence d'autophagie. En effet, nous avons observé une activation de l'autophagie, mesurée par marquage immunohistochimique des protéines pro-autophagique Bécline 1 et LC3, et en conséquence, à une réduction de la nécrose, en particulier dans les foies stéatosiques préconditionnés. L'autophagie possède un rôle physiologique dans la régénération d'ATP et d'acides aminés pour le maintien de l'homéostasie métabolique. Les besoins métaboliques plus importants pour la stéatose que pour les foies non stéatosiques pourraient expliquer l'activation de l'autophagie dans la prolongation de la survie des hépatocytes endommagés après un stress I/R.

La nécrose et les lésions vasculaires induites par l'I/R ont précédemment été associées à une augmentation du risque de rejet aigu et chronique (Halloran et al 1997). D'une façon intéressante, nous avons montré que le PI ne diminue significativement l'incidence des rejets aigus et chroniques que chez les receveurs des greffons stéatosiques. Aussi, une tolérance à la mort cellulaire nécrotique, comme nous l'avons observé à l'instar d'autres équipes (Franchello et al 2009), et une diminution de la réponse inflammatoire pourraient en partie expliquer cette observation. En effet, les lésions péri-opératoires induites par l'I/R au cours de la transplantation peuvent libérer des cytokines pro-inflammatoires et des nucléotides qui augmentent la réponse immunitaire et provoquent une inflammation vasculaire et tissulaire dans les organes greffés (Rao & Pober 2008).

En conclusion, l'induction de l'autophagie pourrait promouvoir une survie cellulaire temporaire en rétablissant une concentration intracellulaire d'ATP et en diminuant la libération des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules endommagées. Pour ces raisons, son intérêt clinique dans le contexte de la transplantation d'organes marginaux mérite d'être approfondi.

Citation: Cell Death and Disease (2011) 2, e111; doi:10.1038/cddis.2010.89
© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/11
www.nature.com/cddis

Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes

D Degli Esposti[1,2,3], M Sebagh[4], P Pham[1,2], M Reffas[1,2], C Poüs[5], C Brenner[6], D Azoulay[2,7] and A Lemoine*[,1,2,3]

Whether ischemic preconditioning (IP) reduces ischemia/reperfusion (I/R) injury in human normal and fatty livers remains controversial. We compared two independent groups of liver donor transplants with *versus* without steatosis to evaluate IP consequences. Liver donors with ($n=22$) or without ($n=28$) steatosis either did or did not undergo IP before graft retrieval. Clinical data from the recipients, as well as histological and immunohistological characteristics of post-reperfusion biopsies were analyzed. Incidence of post-reperfusion necrosis was increased (10/10 *versus* 9/14, respectively; $P<0.05$) and the clinical outcome of recipients was worse for non-IP steatotic liver grafts compared with non-IP non-steatotic grafts. IP significantly lowered the transaminase values only in patients receiving a non-steatotic liver. An increased expression of beclin-1 and LC3, two pro-autophagic proteins, tended to decrease the incidence of necrosis ($P=0.067$) in IP steatotic livers compared with non-IP steatotic group. IP decreased the incidence of acute and chronic rejection episodes in steatotic livers (2/12 *versus* 6/10; $P=0.07$ and 2/12 *versus* 7/10; $P<0.05$, respectively), but not in non-steatotic livers. Thus, IP may induce autophagy in human steatotic liver grafts and reduce rejection in their recipients.

Cell Death and Disease (2011) **2**, e111; doi:10.1038/cddis.2010.89; published online 13 January 2011
Subject Category: Experimental Medicine

In steatotic livers, hepatocytes cell death and inflammatory response have a great impact in both surgical and medical context.[1,2] Indeed, steatotic livers are more sensitive to ischemia–reperfusion (I/R) injury.[3,4] Operative mortality rate associated with steatosis after major liver resection has been reported as high as 14% compared with 2% for healthy livers.[4] Steatotic liver grafts are more frequently used in the context of transplantation and they are associated with a primary non-function rate of 60% compared with <5% for non-steatotic grafts.[5,6] Therefore, developing protective strategies to minimize the adverse effects of I/R injury in steatotic livers is of paramount importance.

Ischemic preconditioning (IP), first described in the heart by Murry *et al.*,[7] consists of brief periods of vascular occlusion which confer protection against subsequent I/R via endogenous protective mechanisms. In the liver, IP was shown to lower transaminase levels and reduce endothelial cell injury.[8] This protection has been linked to various mechanisms, such as decreased apoptosis,[9] preservation of the ATP content in liver tissue,[8,10] or overproduction of pro-survival and anti-inflammatory proteins.[11]

The beneficial effects of IP in human liver hepatectomy, associated with warm and short ischemia have been demonstrated in young patients and patients with liver steatosis.[8] In liver transplantation, some previous studies have demonstrated controversial results of the role of IP on liver grafts. Our group was the first to show a significant decrease in transaminase levels after IP counterbalanced by decreased early function of the graft.[12] Jassem *et al.*[13] found a significant reduction of transaminase levels in IP patients compared with non-IP patients in the post-operative period, whereas Koneru *et al.*,[14] found a paradoxal effect of higher transaminase peak in IP livers. These studies have shown that steatosis was a significant worsening parameter for I/R injuries, although none of them have specifically studied the role of IP on steatotic or non-steatotic livers. Recently, Franchello *et al.*[15] compared normal livers with marginal livers, including mostly livers from donors over the age of 60. They have shown that IP reduced the AST and ALT mean levels 5 min after reperfusion during the first 3 operative days. Interestingly, they also observed that IP induced a lower rate of hepatocyte cell death as assessed by TUNEL assay, the apoptotic index being higher in marginal livers compared with normal livers outside the context of preconditioning. Therefore, our objective was to focus on macro–microvesicular

[1]AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif Cedex 94804, France; [2]Inserm U1004, Université Paris 11, Institut André Lwoff, PRES Universud-Paris, 12-14 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif 94800, France; [3]Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, Châtenay-Malabry Cedex 92296, France; [4]AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service d'Anatomie Pathologique, Inserm U785, Université Paris 11, Institut André Lwoff, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif Cedex 94804, France; [5]EA4530, Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, Châtenay-Malabry Cedex 92296, France; [6]UMR-S 769 Signalisation et Physiopathologie Cardiaque, Université Paris 11, PRES Universud-Paris, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, Châtenay-Malabry Cedex 92296, France and [7]AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Centre Hépatobiliaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif Cedex 94804, France
*Corresponding author: A Lemoine, AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif 94800, France. Tel: +33 014 559 3693; Fax: +33 014 559 3625; E-mail: antoinette.lemoine@pbr.aphp.fr, antoinette.lemoine@u-psud.fr
Keywords: steatosis; liver transplantation; ischemia/reperfusion; ischemic preconditioning; autophagy; liver
Abbreviation: IP, ischemic preconditioning
Received 04.10.10; revised 10.11.10; accepted 18.11.10; Edited by M Federici

steatotic livers that underwent cold ischemia, and preservation during liver transplantation to determine whether and how IP could influence cell death and clinical efficacy or safety in the recipients.

Results

Donor, recipient and intraoperative data. In all, 22 donor livers out of 50 showed steatosis. Steatosis was globally graded as mild (<30% of steatotic hepatocytes) in 16 livers and moderate in 6 (steatotic hepatocytes >30% but <60%). In all, 17 livers showed mixed macro and microvesicular steatosis, with macrovesicular ranging from >1 to ≤30% and microvesicular ranging from >5 to ≤50%. Three steatotic liver grafts showed only microvesicular steatosis ranging from 20 to 40% of hepatocytes. Two others showed only macrovesicular steatosis affecting 10% of hepatocytes. There was no significant difference in distribution of age and hospitalization stay for graft donors before transplantation between groups (Table 1). No significant differences were observed in recipients with regard to age, gender or initial disease before transplantation (Table 2), nor for surgical parameters (Table 3).

Clinical and histological outcomes in patients receiving non-steatotic or steatotic allografts without IP. When comparing the two groups of patients who did not undergo IP, higher mean values in both peak and day 5 levels of AST and ALT were observed in recipients of steatotic grafts compared with recipients of non-steatotic grafts, although these differences were not statistically significant because of high inter-patient variability (Table 4). Mean AST and ALT peaks were 862 and 728 IU/l in patients receiving steatotic grafts, whereas they were 458 and 577 IU/l in patients receiving non-steatotic grafts. AST and ALT day 5 levels were 139 and 423 IU/l in patients receiving steatotic grafts and 79 and 247 IU/l in patients receiving non-steatotic grafts (Table 4). Levels of serum bilirubin at day 7 were significantly higher in steatotic livers compared with non-steatotic livers, whereas no difference was observed in PT levels (Table 4). No significant differences in post-transplantation intensive care unit stay (12 days *versus* 11 days) or total hospitalization stay

Table 1 Allografts characteristics before transplantation in IP and non-IP donors

	Non-steatotic allografts		Steatosic allografts					
Variable	IP ($n=14$) group I	Non-IP ($n=14$) group II	IP ($n=12$) group III	Non-IP ($n=10$) group IV	*P*-value I *versus* II[a]	*P*-value III *versus* IV[a]	*P*-value I *versus* III[a]	*P*-value II *versus* IV[a]
Age of donor (years)	47.9 ± 13.6	50.1 ± 12.1	50.5 ± 8.4	54.7 ± 10.3	0.65	0.30	0.57	0.34
Donor hospitalization (days in intensive care unit)	1.9 ± 1.1	1.8 ± 1.0	2.1 ± 1.3	1.6 ± 0.9	0.67	0.38	0.73	0.77
Body mass index	21.7 ± 3.3	23.7 ± 2.9	25.1 ± 3.7	24.9 ± 2.3	0.11	0.87	0.02	0.29
Histology before reperfusion								
Necrosis								
Absent	12/14	13/14	12/12	9/10	0.39	0.45	0.28	0.51
Mild	1/14	1/14	0/12	0/10	0.52	—	0.54	0.58
Moderate	1/14	0/14	0/12	1/10	0.50	0.45	0.54	0.42
Steatosis								
Absent	14/14	14/14	0/12	0/10	—	—	10^{-7}	5×10^{-7}
Mild (0–30%)	0/14	0/14	8/12	8/10	—	0.30	3×10^{-4}	6×10^{-5}
Moderate (30–60%)	0/14	0/14	4/12	2/10	—	0.30	0.03	0.16
High glycogen content (grading ≥2)	6/14	9/14	8/12	9/10	0.16	0.19	0.15	0.15

[a]Means were compared using the Student's *t*-test
Dichotomous variables were compared using the Fisher's exact test

Table 2 Patients (recipients) characteristics before receiving IP or non-IP livers

	Non-steatotic allografts		Steatosic allografts					
Variable	IP ($n=14$) group I	Non-IP ($n=14$) group II	IP ($n=12$) group III	Non-IP ($n=10$) group IV	*P*-value I *versus* II[a]	*P*-value III *versus* IV[a]	*P*-value I *versus* III[a]	*P*-value II *versus* IV[a]
Age of recipients (years)	50 ± 14	45 ± 14	47 ± 12	45 ± 13	0.38	0.68	0.55	0.89
Gender (M/F)	8/6	9/5	10/2	9/1	0.28	0.43	0.13	0.15
Etiology								
Alcoholic cirrhosis	2/14	2/14	4/12	3/10	0.40	0.35	0.20	0.26
HBV cirrhosis	3/14	3/14	1/12	1/10	0.35	0.52	0.29	0.34
HCV cirrhosis	4/14	4/14	3/12	3/10	0.32	0.77	0.32	0.64
Others	5/14	5/14	4/12	3/10	0.30	0.73	0.70	0.33

[a]Means were compared using the Student's *t*-test
Dichotomous variables were compared using the Fisher's exact test

Table 3 Surgical data during liver transplantation in patients receiving a IP and non-IP allograft

Variable	Non-steatotic allografts		Steatosic allografts					
	IP ($n=14$) group I	Non-IP ($n=14$) group II	IP ($n=12$) group III	Non-IP ($n=10$) group IV	*P*-value I *versus* II[a]	*P*-value III *versus* IV[a]	*P*-value I *versus* III[a]	*P*-value II *versus* IV[a]
Allograft weight (g)	1333 ± 192	1533 ± 403	1622 ± 494	1540 ± 314	0.11	0.67	0.06	0.96
Portal ischemic time (min)	435 ± 127	476 ± 151	424 ± 134	429 ± 76	0.44	0.91	0.83	0.38
Arterial ischemic time (min)	36 ± 25	35 ± 24	50 ± 22	40 ± 15	0.88	0.26	0.16	0.56
Blood units	8.1 ± 10.2	5.9 ± 5.2	7.8 ± 11.1	7.5 ± 9.2	0.46	0.94	0.94	0.58
Surgical complications (vascular or biliary)	3/14	2/14	3/12	3/10	0.34	0.35	0.35	0.27

[a]Means were compared using the Student's *t*-test
Dichotomous variables were compared using the Fisher's exact test

Table 4 Clinical data during liver transplantation in patients receiving a IP and non-IP allograft

Variable	Non-steatotic allografts		Steatosic allografts					
	IP ($n=14$) group I	Non-IP ($n=14$) group II	IP ($n=12$) group III	Non-IP ($n=10$) group IV	*P*-value I *versus* II[a]	*P*-value III *versus* IV[a]	*P*-value I *versus* III[a]	*P*-value II *versus* IV[a]
Hepatic function								
AST at day 5 (IU/l)	42 ± 33	79 ± 57	55 ± 40	139 ± 164	0.047	0.10	0.37	0.22
ALT at day 5 (IU/l)	82 ± 39	247 ± 194	222 ± 246	423 ± 409	0.005	0.17	0.046	0.17
AST peak (IU/l)	235 ± 189	458 ± 308	881 ± 1323	862 ± 762	0.029	0.96	0.08	0.09
ALT peak (IU/l)	187 ± 94	577 ± 361	795 ± 796	728 ± 724	0.0006	0.84	0.009	0.51
PT (%) at day 5	61 ± 13	67 ± 10	63 ± 20	68 ± 9	0.18	0.48	0.73	0.74
Bilirubin at day 7 (μmol/l)	46 ± 44	38 ± 21	106 ± 148	78 ± 45	0.55	0.57	0.16	0.007
Hospitalization								
Intensive care unit stay (days)	12 ± 7	11 ± 6	15 ± 10	12 ± 5	0.67	0.42	0.47	0.59
Total stay in hospital (days)	28 ± 8	29 ± 13	52 ± 43	33 ± 9	0.70	0.18	0.049	0.53
Retransplantation	1/14	1/14	0/12	0/10	—	—	0.52	0.52
Rejection								
Acute rejection	2/14	5/14	2/12	6/10	0.15	0.048	0.40	0.17
Rejection activity index (mean ± S.D.)	5 ± 1.4	5.2 ± 1.3	5 ± 1.7	4.7 ± 0.9	0.86	0.73	1.00	0.66
Acute rejection delay (median in month)	0.5	1.25	0.5	2	0.84	0.92	0.99	0.99
Chronic rejection	0/14	2/14	2/12	7/10	0.24	0.017	0.20	0.009
Ductopenia (mean ± S.D. in %)	—	44.5 ± 15.6	49.7 ± 23.1	36.5 ± 10.2	—	0.15	—	0.22
Chronic rejection delay (median in month)	—	42	9	36	—	0.09	—	1.00
Follow-up (mean ± S.D. in months)	53 ± 18	60 ± 30	47 ± 27	64 ± 26	0.44	0.16	0.51	0.76

[a]Means were compared using the Student's *t*-test
Dichotomous variables were compared using the Fisher exact test
Medians were compared with Kolmogorov–Smirnov test

(33 days *versus* 29 days) were observed between the 10 steatotic and the 14 non-steatotic grafts recipients (Table 4).

No differences in the incidence of acute rejection (AR 6/10 *versus* 5/14) nor in rejection activity index were observed (Table 4). However, a statistically significant increase in the incidence of chronic rejection (CR) was observed in recipients of steatotic grafts compared with recipients of non-steatotic grafts (7/10 *versus* 2/14; $P<0.01$), whereas no differences in severity of ductopenia was observed (Table 4).

Histological changes in livers following transplantation were analysed. Necrotic cells associated with polymorphonuclear infiltrate were observed in centrolobular areas, throughout the lobule and periportal spaces. Surgical necrosis was more frequently observed in patients receiving steatotic grafts compared with patients receiving non-steatotic grafts (10/10 *versus* 9/14 $P<0.05$; Figure 1, Table 5). However, no differences in necrotic index was observed between the two groups (Table 5). Apoptotic cell death was evaluated by activated caspase 3 immunostaining. Apoptotic cells were mostly detected in centrolobular areas in both steatotic and non-steatotic hepatocytes (Figure 2a). In particular, activated caspase 3 was more frequently detected in patients receiving steatotic grafts compared with non-steatotic grafts (3/10 *versus* 0/14; $P=0.059$).

Effects of IP on clinical and histological outcomes of patients receiving steatotic allografts. IP did not significantly change transaminase peaks and day 5 levels in recipients of steatotic allografts. In particular, mean AST and ALT peaks were 881 and 795 IU/l in IP graft recipients compared with 862 and 728 IU/l in non-IP graft recipients. Mean AST and ALT day 5 levels were lower, but not significantly, in IP graft recipients compared with non-IP graft recipients (55 and 222 IU/l *versus* 139 and 423 IU/l,

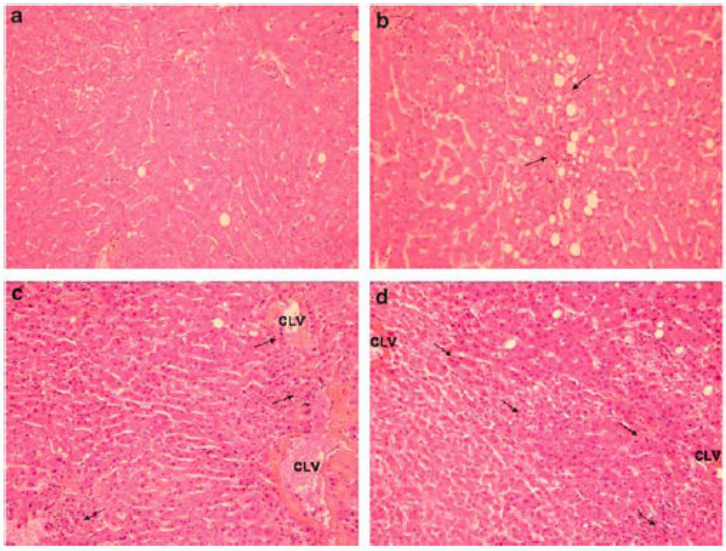


Figure 1 Representative images of different grades of necrosis. (**a**) Absence of necrosis (× 200). (**b**) Mild necrosis: few foci of polymorphonuclear cells (arrows) can be observed through the lobule surrounding few necrotic hepatocytes (× 200). (**c**) Moderate necrosis: some foci of polymorphonuclear cells can be observed around the section of the centrolobular vein (CLV) associated to some necrotic hepatocytes (× 200). (**d**) Severe necrosis: large necro-inflammatory area with bridging between two centrolobular veins (CLV; × 200)

Table 5 Histological and immunohistochemical and analysis on post-reperfusion livers

	Non-steatotic allografts		Steatosic allografts					
Variable	**IP ($n=14$) group I[a]**	**Non-IP ($n=14$) group II**	**IP ($n=12$) group III**	**Non-IP ($n=10$) group IV**	***P*-value I *versus* II[b]**	***P*-value III *versus* IV[b]**	***P*-value I *versus* III[b]**	***P*-value II *versus* IV[b]**
Surgical necrosis (presence)	9/14	9/14	8/12	10/10	0.30	0.067	0.32	0.047
Absent	5/14	5/14	4/12	0/10	0.30	0.067	0.32	0.047
Mild	7/14	7/14	5/12	7/10	0.29	0.15	0.28	0.21
Moderate	1/14	1/14	2/12	3/10	0.52	0.30	0.36	0.16
Severe	1/14	1/14	1/12	0/10	0.52	0.54	0.52	0.58
Necrotic index	0.71 ± 0.67	0.67 ± 0.61	0.80 ± 0.71	0.97 ± 0.32	0.85	0.50	0.75	0.17
Activated caspase 3	0/12	0/14	1/12	3/10	—	0.20	0.50	0.059
Beclin 1	2/12	0/14	9/12	2/10	0.20	0.015	0.006	0.16
LC3	2/12	2/14	9/12	3/10	0.40	0.046	0.006	0.26
Beclin 1+ LC3	1/12	0/14	7/12	2/10	0.46	0.071	0.014	0.16

[a]In all, 12 paraffin blocks were available for group I to allow further immunohistochemical analysis
[b]Means were compared using the Student's *t*-test
Dichotomous variables were compared using the Fisher's exact test

respectively). Lower PT and higher serum bilirubin, although not significantly, were observed in IP grafts compared with non-IP grafts (Table 4). No significant differences in post-transplantation intensive care unit stays were observed between the two groups (15 days *versus* 12 days). Total hospitalization stay was longer, but not significantly different, for IP graft recipients compared with non-IP recipients (52 days *versus* 33 days; Table 4).

Interestingly, IP significantly decreased the incidence of both AR and CR in recipients of steatotic grafts compared with recipients of non-IP steatotic grafts (2/12 *versus* 6/10 for AR and 2/12 and 7/10 for CR; $P<0.05$; Table 4). However, IP did not change the rejection activity index, nor severity of ductopenia in steatotic allografts (Table 4).

Histological examination showed that IP tended to decrease the incidence of surgical necrosis in steatotic grafts (8/12 *versus* 10/10; $P=0.067$). However, no differences in necrotic index was observed between the two groups (Table 5). No difference in the detection of activated caspase 3 was observed in IP steatotic livers compared with non-IP steatotic livers (Table 5).

Effects of IP on clinical and histological outcomes of patients receiving non-steatotic allografts. IP significantly decreased both AST and ALT peak and day 5 levels in non-steatotic allografts recipients. In particular, mean AST and ALT peak were 235 and 187 IU/l in recipients of IP livers compared with 458 and 577 in recipients of non-IP livers

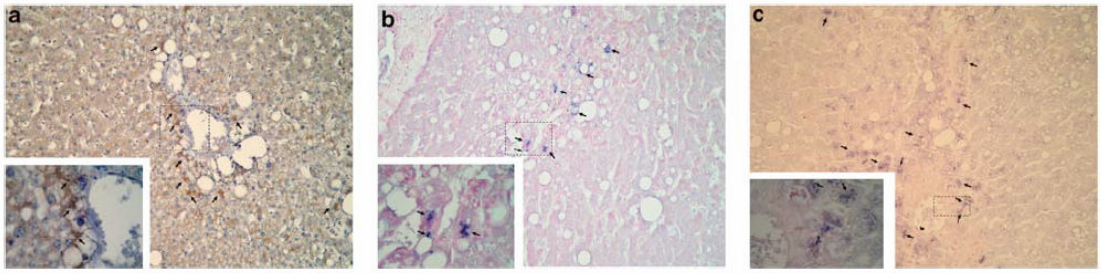


Figure 2 Assessment of activated caspase 3, beclin-1 and LC3 in steatotic preconditioned livers. (**a**) Activated caspase 3 expression in the hepatocytes of a centrolobular region (arrows; × 400). Hepatocytes expressing activated caspase 3 circumscribed within the dashed lines are shown enlarged in the inset (× 1000). (**b**) Beclin-1 expression in the hepatocytes located in a centrolobular region and also in the lobule (× 400). Centrolobular hepatocytes expressing beclin-1 circumscribed within dashed lines are shown enlarged in the inset (× 1000). (**c**) LC3 expression in the hepatocytes located in a centrolobular region and also in the lobule (× 400). Centrolobular hepatocytes expressing LC3 circumscribed within dashed lines are shown enlarged in the inset (× 1000)

($P<0.05$ and $P<0.01$ for AST and ALT peaks, respectively). Mean AST and ALT day 5 levels were 42 and 82 IU/l in recipients of IP livers compared with 79 and 247 IU/l in recipients of non-IP livers ($P<0.05$ and $P<0.01$ for AST and ALT day 5 levels, respectively). Lower PT and higher serum bilirubin were observed, although not significantly, in IP grafts compared with non-IP grafts (Table 4). No significant difference in post-transplantation intensive care unit stays (12 days *versus* 11 days) or total hospitalization stays (28 days *versus* 29 days) was observed between the IP or non-IP non-steatotic graft recipients (Table 4).

No difference in the incidence of AR or CR was observed in these two groups (2/14 *versus* 5/14 for AR and 0/14 *versus* 2/14 for CR), as well as in rejection activity index or ductopenia severity (Table 4).

Histological examination did not show any difference in the incidence or severity of surgical necrosis neither in necrotic index (Table 5). No apoptotic cells were detected either in IP nor in non-IP biopsies (Table 5).

IP activates autophagy in steatotic allografts. As we previously showed that autophagy is activated by IP in steatotic and peliotic livers treated by chemotherapy,[16] we investigated the presence of autophagy biomarkers in post-reperfusion biopsies of this series to evaluate the potential role of autophagy in steatotic livers.

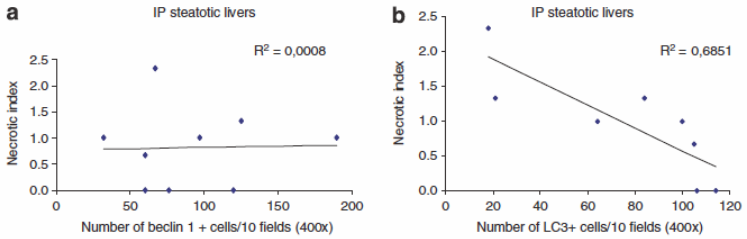
The presence of autophagy markers was assessed by immunohistochemical detection of beclin-1 and LC3, these two proteins being essential for the macroautophagic process and, respectively, representing an early and a late marker of autophagy.[17] Hepatocytes showing positive staining for both proteins were found mainly in the centrolobular areas, although some positive hepatocytes were observed throughout the lobule (Figures 2b and c). Beclin-1 and LC3 staining were rarely observed in post-reperfusion non-steatotic livers. In particular, only one IP non-steatotic liver was positive for both protein stains, whereas 7/12 IP steatotic livers showed positive staining for both beclin-1 and LC3 ($P<0.05$; Table 5). Double-positive staining for beclin-1 and LC3 was more frequently observed in IP steatotic livers compared with non-IP steatotic livers, although the results did not reach statistical significance (7/12 *versus* 2/10; $P=0.07$; Table 5). When we considered only immunohistochemical-positive biopsies, we observed a statistically significant increased number of beclin-1-positive cells in IP steatotic livers compared with non-IP steatotic livers (Figure 3). Interestingly, we observed an inverse correlation between the number of LC3-positive cells and the necrotic index in IP steatotic livers, whereas no correlation was observed in the other groups. No correlation between the number of beclin-1-positive cells and the necrotic index was observed (Figure 3).

Discussion

In this study, we showed that IP may be beneficial for both patients receiving either steatotic or non-steatotic allografts, although biological mechanisms mediating IP effects did differ. IP tended to reduce parenchyma necrosis and subsequent graft rejection incidence in recipients of steatotic grafts. The activation of autophagy could have an important role to ensure cell homeostasis, and limit necrosis and graft rejection in steatotic livers.

Ischemia was more deleterious in steatotic grafts compared with non-steatotic livers as shown by transaminase levels after transplantation and the presence of surgical necrosis in post-reperfusion biopsies of non-IP livers. Our results are in accordance with previous observations in human or experimental liver surgery.[4,18] Chronic necrosis, generally associated with lower ATP levels[19] and increased inflammatory response in the parenchyma,[20] could explain that steatotic livers are less resistant to I/R injuries.[4,18]

The main parameter considered to assess I/R injury was serum transaminases level. However, contrasting results were published. The discrepancies in the significance of transaminases values can be attributed to different sample timing after transplantation and to high interpatient variability, particularly in marginal grafts such as steatotic livers, as we can observe here, or grafts from donors >60 years of age.[15] Indeed, we showed that IP significantly decreased transaminases levels in non-steatotic livers, whereas a nonsignificant decrease was observed in IP steatotic liver. Moreover, the groups of patients with improved transaminase levels did not benefit from shorter hospitalization stays, as also observed in other studies.[21,22] Therefore, more accurate biological markers are needed to better assess I/R injuries and the subsequent effects of IP.



c Number of beclin1 or LC3 positive cells detected in 10 fields at 400x magnification in immunohistochemical positive biopsies

	IP non steatotic livers (m±σ)	Non- IP non steatotic livers (m±σ)	IP steatotic livers (m±σ)	Non- IP steatotic livers (m±σ)
Beclin1	36±11	-	82±31#	25±1
LC3	35±21	6±3	71±40	41±7

Statistically significant ($p<0.05$) compared to non-IP steatotic livers using T-Student test

Figure 3 Expression of autophagy markers in human liver biopsies and correlation with necrotic index. (**a**) Correlation between beclin-1 expression and necrotic index in IP steatotic livers. (**b**) Correlation between LC3 expression and necrotic index in IP steatotic livers. (**c**) Beclin-1 and LC3 expression in immunohistochemical-positive biopsies in all studied groups

Similarly, the decrease of apoptosis has been reported as a biological protective mechanism triggered by IP.[23] It has been mostly assessed by TUNEL assay or caspase 3 or Bcl-2 expression levels evaluation. However, results were not always conclusive.[15,16,23] This can be because of the use of the TUNEL assay that can not discriminate between apoptosis or necrosis cell death,[9] or to the comparison of groups of biopsies that included steatotic livers or livers from donors over the age of 60. Indeed, steatotic livers have been reported to have higher levels of oxidative or nitrosative radicals with subsequent oxidized lipids and proteins,[24] and consequently lower intracellular ATP levels, thus favoring necrotic cell death following I/R injury.[24,25] In our study, we observed that steatotic livers frequently exhibited necrosis although non-steatotic livers did not. Interestingly, IP tended to decrease the incidence of necrosis without changing apoptosis in IP steatotic livers. We can note, as in other studies,[15,26] that apoptosis assessed by caspase 3 activation was not a major mechanism triggered by I/R. Few hepatocytes exhibited caspase 3 activation. We can hypothesize that other apoptotic pathways could be activated or that apoptosis was controlled. Recently, autophagy has been described to be activated in stress conditions to ensure cell survival by limiting necrosis or apoptosis *in vivo*.[27] Autophagy is a catabolic pathway triggered following various stress conditions, such as starvation or transient hypoxia, and aimed to restore adequate intracellular ATP and aminoacids levels and to eliminate damaged organelles.[28,29] It is reported that autophagy cross-talks with apoptotic and necrotic cell death pathways,[17] and that activation of autophagy may favour cellular survival by decreasing reactive oxygen species production.[30] In other cellular contexts, autophagy has been shown to retard cell death by suppressing ER stress.[31] Actually, ER stress has been recently described to have a role in the pathogenesis of liver steatosis[32,33] and ER stress inhibition has been shown to be protective under I/R in an experimental model of steatotic/non-steatotic partial hepatectomy.[34] Thus, we can speculate that in our context, activation of autophagy may be involved in ER stress attenuation in steatotic livers, and that the modulation of autophagy and ER stress can have beneficial effects in liver pathologies. Accordingly, our group has described that IP can trigger autophagy to switch on/off necrosis and/or apoptosis in steatotic or peliotic livers from patients formerly treated by several courses of chemotherapy.[16] In this study, the decreased trend of incidence of necrosis that we observed was associated with a significant increased expression of autophagy markers in steatotic livers. Thus, the induction of autophagy, especially in IP steatotic livers, was in favor of the restoration of sufficient energetic levels and aminoacids availability in injured hepatocytes to prolong their survival under I/R stress. It is noteworthy that high ATP levels have been correlated with better post-transplantation outcomes.[35,36]

Tissue necrosis and vascular injury caused by I/R has been associated with an increased risk of acute and chronic graft rejection.[37] Interestingly, in our study IP significantly decreased mild AR and mild CR incidences only in recipients of steatotic livers. A decrease in AR was previously observed in recipients of IP liver in other studies[13–15] and in particular Franchello *et al.* showed that IP increased survival rates at 6 months in marginal grafts but not in non-marginal grafts (which had, however, a higher survival rate compared with marginal livers). The biological mechanism involved in the decrease graft rejection after IP remains to be elucidated. However, a decreased sensitivity in necrotic cell death that we and other authors observed[15] and probably a decreased inflammatory response observed by another group[13] may be involved. It has been hypothesized that perioperative allograft injury induced by I/R releases mediators, such as TNFα, IL1α, HMGB1, and cellular nucleotides, that enhance destructive adaptive immune responses driving vascular inflammation and production of IL1β within grafted organs.[38] Interestingly, TNFα signaling, known as a mediator of inflammation in liver and adipose tissue, has been recently shown to be involved also in NAFLD pathogenesis.[39,40] Thus, the induction of autophagy may promote cell survival by restoring adequate

intracellular ATP levels and consequently decreasing the release of inflammation mediators by injured cells. In our clinical context, we cannot conclude whether autophagy has a pro-survival role or an ATP restoring function, but a better understanding of autophagy activation during IP may lead clinical improvements in post-transplantation outcomes of patients receiving steatotic grafts.

Patients and Methods

Study population and experimental design. Among the patients who underwent a liver transplantation in our institution from 2000: (1) in an elective situation, (2) with a whole deceased donor liver, (3) from a donor without cardiac arrest or severe hemodynamical instability before retrieval, we analyzed patients who received an IP steatotic graft ($n=12$) and we compared them with age-matched patients receiving non-IP steatotic liver grafts ($n=10$), IP non-steatotic liver grafts ($n=14$) or non-IP non-steatotic liver graft ($n=14$). Only patients receiving a graft from a donor staying <4 days in an intensive care unit and not having an alcohol-induced accident were included in the study. The mean duration stay of donors in an intensive care unit was 1.9 ± 1.1 days. The protocol of preconditioning (10 min of portal triad clamping followed by 10 min of reperfusion followed by multiorgan recovery) is the same as used in the previous clinical studies performed at our institution.[12,21] All post-reperfusion biopsies were taken at the same time before closure of the abdomen. The protocol was approved by our center's investigation and review board, and was always accepted by the teams recovering other organs. The pre-transplant characteristics of graft donors are shown in Table 1. I/R injury was evaluated as transaminase peak levels and transaminase levels 5 days after transplantation (day 5). A routine histological examination on post-reperfusion livers was performed to assess the degree of steatosis and surgical necrosis.

Each group was followed until July 2010 in order to evaluate the incidence and the grading of AR and CR of liver grafts after liver transplantation.

Histological evaluation. Samples were fixed in alcohol–formalin–acetic acid, embedded in paraffin and stained with standard haematoxylin eosin safran and picrosirius stain. Histological review was made by an experienced pathologist (MS) without knowledge of the state of IP of the graft or other clinical data. The review concerned post-reperfusion surgical biopsies. Histological features, including steatosis and 'surgical' necrosis, were assessed semi-quantitatively. Steatosis of macro and microvacuolar type was graded as mild (0–30%), moderate (30–60%) or severe (60–100%). Severely steatotic livers are discarded and not used for transplantation. When mixed steatosis was observed, the overall degree was calculated adding the macro and microvacuolar degrees. 'Surgical' necrosis was defined as patchy necrosis associated with polymorphonuclear infiltrate and graded as mild (score = 1), moderate (score = 2) and severe (score = 3). To assess a necrotic index, the mean score between lobular, periportal and perivenous necrosis was calculated for each biopsy. The review also concerned liver biopsies performed in the recipient after liver transplantation, especially in order to assess the presence of AR and CR, both graded according to the relevant Banff classifications.[22] A rejection activity index was used to score liver allograft biopsies with AR, whereas severity of ductopenia was used to score liver allograft biopsies with CR.

Immunohistological procedures. All but two liver samples were available for immunostaining. Immunohistology was performed on 4 μm paraffin-embedded formalin-fixed tissue sections using activated anti-human rabbit caspase 3 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-human mouse beclin-1 (an early and essential autophagic protein; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA) and anti-human rabbit anti LC3 (a late autophagic protein; MBL, Nagoya, Japan) antibodies. Antigen retrieval was obtained by heat at 97°C in a citrate buffer at pH 6 and in Tris-citrate buffer for beclin-1 and LC3 and at pH 9 with 0.5% saponine for activated caspase 3. The revelation system was based on a three-step biotin-free immunophosphatase stain using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium chromogene substrate (Dako, Glostrup, Denmark) followed by nuclear red counterstaining for beclin-1 and LC3 detection, whereas it was a one-step biotin free immuno-peroxidase stain (ImmPress, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) using 3,3-diamino-benzidine chromogene (Dako) substrate followed by Hemalun counter-staining for activated caspase 3.

Statistical analysis. Results are expressed as mean and standard deviation. Mean results were compared in the different groups with the help of variance analysis. Student *t*-tests after normalization of variables were used to compare two means. For dichotomous variables, a Fisher exact test was used. Median was used to compare AR or CR delay. Median results were compared in the different groups with Kolmogorov–Smirnov tests.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. Davide Degli Esposti is a fellow of NRB-Vaincre le Cancer and Groupement Coopératif de Transplantation de l'Ile de France.

1. Mahli H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 2010; **90**: 1165–1194.
2. Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* 2007; **245**: 44–50.
3. Peralta C, Roselló-Catafau J. The future of fatty livers. *J Hepatol* 2004; **41**: 149–151.
4. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 1998; **2**: 292–298.
5. Canelo R, Braun F, Sattler B, Klinge B, Lorf T, Ramadori G *et al.* Is a fatty liver dangerous for transplantation? *Transplant Proc* 1999; **31**: 414–415.
6. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ *et al.* The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; **51**: 157–163.
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia preconditioning: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**: 1124–1136.
8. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V *et al.* A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with *versus* without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; **238**: 843–850.
9. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis *versus* oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1246–1257.
10. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003; **20**: 383–396.
11. Barrier A, Olaya N, Chiappini F, Roser F, Scatton O, Artus C *et al.* Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion. *FASEB J* 2005; **19**: 1617–1626.
12. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebagh M, Adam R *et al.* Effects of 10 min of ischemic preconditioning on the cadaveric liver on the graft's preservation and function. *Ann Surg* 2005; **242**: 133–139.
13. Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND, Rela M. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation* 2006; **81**: 169–174.
14. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B *et al.* The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant* 2007; **7**: 2788–2796.
15. Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A, Romagnoli R, Cerutti E *et al.* Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant* 2009; **9**: 1629–1639.
16. Domart MC, Degli Esposti D, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G *et al.* Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. *J Hepatol* 2009; **51**: 881–889.
17. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 741–752.
18. El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology* 2007; **45**: 855–863.
19. Peralta C, Batrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats M *et al.* Adenosin monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2001; **34**: 1164–1173.
20. VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol* 2009; **175**: 355–364.
21. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P *et al.* Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg* 2006; **202**: 203–211.
22. Banff Working Group, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F *et al.* Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; **44**: 489–501.

23. Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Farantos C, Theodosopoulos T, Stafyla V *et al.* Ischemic preconditioning confers antiapoptotic protection during major hepatectomies performed under combined inflow and outflow exclusion of the liver. A randomized clinical trial. *World J Surg* 2009; **33**: 1909–1915.
24. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M *et al.* Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; **33**: 808–815.
25. Caraceni P, Bianchi C, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G *et al.* Impairement of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol* 2004; **41**: 82–88.
26. Arab HA, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 1951–1957.
27. Minor T, Stegemann J, Hirner A, Koetting M. Impaired autophagic clearance after cold preservation of fatty livers correlates with tissue necrosis upon reperfusion and is reversed by hypothermic reconditioning. *Liver Transplant* 2009; **15**: 798–805.
28. Huang J, Klionsky DJ. Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1837–1849.
29. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; **26**: 1749–1760.
30. Rouschop KM, Ramaekers CH, Schaaf MB, Keulers TG, Savelkouls KG, Lambin P *et al.* Autophagy is required during cycling hypoxia to lower production of reactive oxygen species. *Radiother Oncol* 2009; **92**: 411–416.
31. Choi CH, Jung YK, Oh SH. Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol* 2010; **78**: 114–125.
32. Lee AH, Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 2835–2850.
33. Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; **23** (Suppl1): S16–S24.
34. Mosbah IB, Alfany-Fernàndez I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A *et al.* Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death and Dis* 2010; **1** (e52): 1–12.
35. Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C, Lee RG, Khettry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology* 1988; **8**: 471–475.
36. Marni A, Ferrero ME, Gaja G. Metabolic function of grafted liver in rats. *Transplantation* 1988; **46**: 830–835.
37. Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V *et al.* The 'injury response': a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 1997; **29**: 79–81.
38. Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection. *Crit Rev Immunol* 2008; **28**: 229–248.
39. Fiorentino L, Vivanti A, Cavalera M, Marzano V, Ronci M, Fabrizi M *et al.* Increased tumor necrosis factor α-converting enzyme activyty induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Hepatology* 2010; **51**: 103–110.
40. Menghini R, Menini S, Amoruso R, Fiorentino L, Casagrande V, Marzano V *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. *Gastroenterology* 2009; **136**: 663–672.

SOME RIGHTS RESERVED

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group.*** **This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

I-3. Etude de l'intérêt clinique du préconditionnement ischémique dans la transplantation hépatique du lobe droit de donneurs vivants

Article 4: Ischemic preconditioning of the graft in adult living related right lobe liver transplantation: impact on ischemia-reperfusion injury and clinical relevance

Andreani P, Hoti E, de la Serna S, **Degli Esposti D**, Sebagh M, Lemoine A, Ichai P, Saliba F, Castaing D, Azoulay D
HPB 2010; 12: 439-446.

Situation du sujet

L'effet du préconditionnement ischémique, qui a été décrit dans les articles précédents, a été étudié pour la première fois dans le contexte de la transplantation hépatique du lobe droit de donneurs vivants.

Notre équipe avait déjà réalisé une première étude afin de rechercher l'intérêt du PI dans la tolérance des foies sains aux lésions d'I/R dans le cadre de la transplantation par don familial (Barrier et al, 2005) Nous n'avions pas montré de bénéfice clinique (Azoulay Ann surg 2005), mais nous avions identifié une signature génique très intéressante qui comportait des gènes codant pour des protéines maintenant décrites dans des mécanismes de survie cellulaire, notamment IL1-ra, le récepteur soluble de l'IL-1 ou HSP-70.

Ici, notre objectif était de rechercher le bénéfice clinique dans une série de 44 patients consécutifs, transplantés avec un greffon provenant du lobe droit et soumis (n=22) ou non (n=22) à un PI chez le donneur vivant. Les lésions d'ischémie/reperfusion, la fonction rénale et hépatique, le taux de morbidité et de mortalité ont été comparés entre les 2 groupes.

Résultats et discussion

Aucune différence n'a été observée entre les 2 groupes concernant la durée d'hospitalisation, le non-fonctionnement primaire du greffon et le taux de rejet aigu. Les pics d'aspartate aminotransferase (AST) et d'alanine aminotransferase (ALT) étaient également similaires dans les 2 groupes.

Le PI du greffon chez les donneurs vivants n'est pas associé à un bénéfice clinique ni chez les receveurs ni chez les donneurs vivants. L'absence d'effet du PI correspond peut être à ce que nous avons décrit précédemment dans le cadre de la transplantation orthotopique, à savoir que seuls les foies stéatosiques pourraient bénéficier d'un IP pour contrer la nécrose. Le temps plus court de

trans-section du greffon chez les donneurs pourrait également influencer l'absence de conséquences post-opératoires du PI.

DOI:10.1111/j.1477-2574.2010.00194.x HPB

ORIGINAL ARTICLE

Ischaemic preconditioning of the graft in adult living related right lobe liver transplantation: impact on ischaemia–reperfusion injury and clinical relevance

Paola Andreani[1], Emir Hoti[1], Sofia de la Serna[1], Davide degli Esposti[2], Mylène Sebagh[3], Antoinette Lemoine[2], Philippe Ichai[1], Fauzi Saliba[1], Denis Castaing[1] & Daniel Azoulay[1]

[1]Centre Hépato-Biliaire, Département de Chirurgie Hépato-Biliaire, IFR 89.9, [2]Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, and [3]Département d'Anatomopathologie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Abstract

Background: Ischaemic preconditioning (IPC) of the right liver graft in the donor has not been studied in adult-to-adult living related liver transplantation (LRLT).

Objective: To assess the IPC effect of the graft on ischaemia reperfusion injury in the recipient and compare recipient and donor outcomes with and without preconditioned grafts.

Patients and methods: Alternate patients were transplanted with right lobe grafts that were (n = 22; Group $_{Precond}$) or were not (n = 22; Group $_{Control}$) subjected to IPC in the living donor. Liver ischaemia–reperfusion injury, liver/kidney function, morbidity/mortality rates and outcomes were compared. Univariate and multivariate analyses were performed to identify factors predictive of the aspartate aminotransferase (AST) peak and minimum prothrombin time.

Results: Both groups had similar length of hospital stay, morbidity/mortality, primary non-function and acute rejection rates. Post-operative AST (P = 0.8) and alanine aminotransferase (ALT) peaks (P = 0.6) were similar in both groups (307 ± 189 and 437 ± 302 vs. 290 ± 146 and 496 ± 343, respectively). In univariate analysis, only pre-operative AST and warm ischemia time (WIT) were significantly associated with post-operative AST peak (in recipients). In multivariate analysis, the graft/recipient weight ratio (P = 0.003) and pre-operative bilirubin concentration (P = 0.004) were significantly predictive of minimum prothrombin time post-transplantation.

Conclusions: Graft IPC in the living related donor is not associated with any benefit for the recipient or the donor and its clinical value remains uncertain.

Keywords

LRLT, graft ischemic preconditioning

Received 5 February 2010; accepted 2 May 2010

Correspondence

Pr. Daniel Azoulay, Centre Hépato-Biliaire, Hôpital Paul Brousse, 94800, Villejuif, France. Tel: +33 45 59 30 36; Fax: +33 45 59 38 57; E-mail: daniel.azoulay@pbr.aphp.fr

Introduction

Living related right lobe liver transplantation (LRRLLT) was a breakthrough in the field of adult liver transplantation[1] (for a review see[2,3]). This technique increased the availability of grafts at a time when there was a critical shortage of cadaveric organs resulting in a very high death rate among patients on waiting lists.[4] It may also improve the prognosis of certain indications.[5,6] Use of the right liver lobe has several advantages over use of the left lobe for adult-to-adult liver transplantation: better anatomic position for the vascular reconstruction, lower risk of hepatic venous outflow block and increased hepatic mass. To ensure donor safety, an adequate liver mass must be left to avoid post-operative hepatic dysfunction. Several strategies have been designed to optimize the function of the liver graft in the recipient and the remaining liver in the donor. These include stringent selection of the donor (with liver biopsy in many centres),[2,3,7] preparation of the recipient, avoidance of vascular clamping during procurement, the choice of the preservation solution and the shortest ischaemia time possible.

This paper was presented at the International Hepato-Pancreato-Biliary Association Meeting, 18–22 April 2010, Buenos Aires, Argentina.

 © 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

Several recent animal studies have shown that ischaemic preconditioning (IPC) (especially brief exposure to warm ischemia) provides robust protection against ischemia–reperfusion injury during subsequent long periods of ischaemia. This phenomenon was first described for the heart.[8] It has since been described in many experimental models (for review see[9,10]) and for several tissues and organs, including the liver.[11–17] It has been shown to be protective in three clinical studies on liver resection.[18–20] It has also been shown that a short period of warm ischaemia protects different organs including the heart, intestine, lung and kidney[21,22] against subsequent cold ischaemia–reperfusion injury. Several studies in experimental models[23–25] and humans[26,27] suggest that IPC is suitable for use during liver transplantation. The aim of the present study was to evaluate the effects of IPC of the right lobe liver graft in the living donor on ischaemia–reperfusion injury in the recipient. We compared the rates of ischaemia–reperfusion injury, early graft function, mortality, morbidity and patient survival in the two groups of recipients. We also assessed the impact of graft IPC on donor outcome.

Patients and methods

Objectives of the study

The primary end point of the study was the graft tolerance to ischaemia reperfusion as assessed by the post-operative peak AST concentration in the recipient.[18–20] Secondary end points included the analysis of the potential clinical relevance of IPC on early graft function, mortality, morbidity and patient survival. We also assessed the impact of graft IPC on donor outcome.

Study population and experimental design

This single centre prospective study was conducted during a 4-year period and included 44 consecutive cases of adult-to-adult LRRLLT. Alternate patients were assigned to the two study groups. Twenty-two patients received a graft that had been preconditioned in the donor (Group $_{Precond}$): 10 min of right pedicle clamping including clamping of all arteries feeding the right liver, the right portal branch(es) and the main bile duct, followed by 10 min of reperfusion. Twenty-two patients received a graft that had not been preconditioned (Group $_{Control}$). LRRLLT performed during the study period for fulminant hepatic failure (four cases) was the only exclusion criteria from the study. The protocol of preconditioning was identical to the one used in the two clinical studies reported so far.[18–20] The sample size calculation was based on the results of the 15 first cases of LRRLLT performed at our centre, by the same surgeon (D.A.) and without any vascular clamping. In these 15 cases the mean peak aspartate aminotransferase (AST) concentration was 274 ± 126 IU/L (standard error = 27.6 IU/L). The sample size needed to detect a significant difference for the peak AST concentration was calculated as 22 cases on each group, using a two-sided test ($\alpha = 0.05, \beta = 0.1$). The protocol of the study was approved by the investigation and review board of our centre. Informed consent was obtained from all donors and recipients.

Surgical procedures

Right liver graft harvesting

The same procurement technique was used throughout the study. This technique has been reported in detail previously.[7] No vascular clamping (except during the preconditioning stage, when applied) was performed during the harvesting procedure. The middle hepatic vein and/or the inferior hepatic vein were included in the graft as indicated.[28,29] The graft was perfused *ex situ* with 1 L of cold University of Wisconsin (UW) solution. All donor hepatectomies were performed by the same surgeon (D.A.).

Transplantation technique

In brief, the native liver was totally removed with caval preservation.[30] A temporary porta-caval shunt was performed.[31] The right lobe was then implanted. A microscope was used for arterial and biliary anastomosis in all cases. All graft implantations were performed by the same surgeon (D.C.). Cold ischaemia time (CIT) was defined as the time between devascularization in the donor and portal reperfusion in the recipient. Warm ischaemia time (WIT) was defined as the time between portal unclamping and arterial revascularization. A liver biopsy was taken before closing the abdomen. This biopsy was available for 19/22 (86%) and 20/22 (91%) of Group $_{Control}$ and Group $_{Precond}$ recipients, respectively ($P > 0.9$). None of the graft was steatotic, as macrovacuolar steatosis >20% of hepatocytes was never observed. Ischaemia–reperfusion injury was classified as moderate to severe (vs. absent) when at least 10% of hepatocytes were necrotic, mainly in the centre of the lobule or disseminated throughout.[32]

Post-operative management

Donors

In addition to the usual post-operative care received after right hepatectomy, we measured the indocyanine green clearance rate at 15 min (ICG $_{RT15'}$) and used CT imaging to measure the volume[33–35] of the remaining left liver 8 and 30 days after donation.

Recipients

Transplanted patients received a standard immunosuppressive regimen including FK-506 and methylprednisolone. Early outcome was assessed by[1] measuring ischaemia–reperfusion liver injury, as estimated by the peak AST concentration[2] liver function tests, including determination of the minimum prothombin time and the peak bilirubin concentration within 10 days of transplantation[3] measuring primary non-function, defined as immediate absence of graft function leading to retransplantation or death[4]. For the later group, the following technical complications were recorded: hemoperitoneum needing reoperation, and arterial, portal, outflow and biliary complications. Histologically proven acute rejection was recorded, provided it occurred within 6 weeks of transplantation and needed increased immunosuppression.[36] Post-operative mortality was defined as death occurring during the initial hospitalization period after transplantation or within 60 days of transplantation.

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

Data analysis

All quantitative data are expressed as mean ± standard deviation. A P-value < 0.05 was considered statistically significant. Factors potentially predictive of the peak AST concentration in the recipient within 10 days of transplantation were assessed by univariate and multivariate analysis. The donor data included: age, pre-operative liver function tests, duration of operation, intra-operative blood loss, volume of autotransfusion and graft preconditioning; and the recipient data included: age, gender, pre-operative liver function tests, graft to recipient body weight ratio, cold ischaemia time, warm ischemia time and transfusion volume.

The same assessment was performed for the minimum prothrombin time. For continuous variables, differences between the groups were evaluated using the Student's t-test. For discrete variables, data were expressed as counts and percentages and were analysed using Fisher's exact test. Survival rates were calculated using the Kaplan–Meier method, and groups were compared with the log rank test. All statistical analyses were performed using SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

Biologists, intensive care specialists and pathologists were not informed whether the graft had been subjected to ischaemic preconditioning in the donor.

Results

Pre- and per-operative data (Tables 1 and 2)

The two donor groups were similar (Table 1) in terms of age ($P = 0.4$), gender ratio ($P = 0.5$), pre-operative liver function tests including the $ICG_{RT15'}$ ($P \geq 0.2$ in all cases), intra-operative data including duration of operation ($P = 0.08$) and volume of autotransfused blood ($P = 0.9$). The remaining left liver to body weight ratio was similar in the two groups ($P = 0.2$).

The two recipient groups were similar (Table 2) in terms of age ($P = 0.8$), gender ratio ($P > 0.9$), indication for transplantation ($P = 0.5$), liver function tests before transplantation ($P > 0.2$ in all cases) and intra-operative data including graft-to-body weight ratio ($P = 0.7$), cold ischaemia time ($P = 0.6$), warm ischaemia time ($P = 0.6$) and number of blood units transfused ($P = 0.9$).

Donor outcome (Table 1)

The peak AST concentration was similar in the two groups of donors (189.0 ± 70.5 vs. 231.5 ± 130.5 IU/L – group without vs. with graft preconditioning, respectively, $P = 0.2$). Liver function tests were similar at all time points, including $ICG_{RT\ 15'}$ at day 8 ($P = 0.8$) and day 30 ($P = 0.9$), and volume of remaining left liver at day 8 ($P = 0.7$) and day 30 ($P = 0.6$).

At least one complication occurred in 11 (morbidity rate = 50%) and 15 (morbidity rate = 68%) donors in the control and preconditioned group, respectively ($P = 0.7$). None of these complications were life-threatening. The duration of hospitalization was similar in the two groups ($P = 0.6$). All donors were alive and well at 24 ± 15 months after donation.

Tolerance to ischaemia–reperfusion in recipients (Table 2, Fig. 1)

We found no significant difference in serum concentrations of AST and ALT between the two groups at any time point. Patients

Table 1 Pre-, per- and post-operative characteristics of right lobe donors

Characteristics	Donor of (R) liver without preconditionning n = 22 cases	Donor of (R) liver with preconditionning n = 22 cases	P-value
Male/female (ratio)	6/16	8/14	0.5
Age (years)	37.8 ± 13.1	41.4 ± 15.4	0.4
Left liver to body weight ratio (%)	0.76 ± 0.15	0.83 ± 0.18	0.2
Duration of operation (minutes)	319 ± 107	274 ± 38	0.08
Number of blood units autotransfused	0.5 ± 0.8	0.5 ± 0.9	0.9
Peak AST (IU/L)	189.0 ± 70.5	231.5 ± 130.5	0.2
Peak ALT (IU/L)	193.1 ± 81.1	236.9 ± 135.2	0.2
Minimum prothrombin time (% of normal)	38.7 ± 7.9	36.0 ± 7.5	0.3
Peak bilirubin (µmol/L)	51.1 ± 22.3	68.8 ± 39.5	0.08
Morbidity rate n cases (%)	11 (50%)	15 (68%)	0.7
Duration of hospital stay (days)	13.4 ± 6.4	14.1 ± 4.1	0.6
$ICG_{RT\ 15'}$			
Day 8	12.7 ± 4.2	12.1 ± 6.7	0.8
Day 30	11.3 ± 4.0	11.7 ± 6.5	0.9
Left liver to body weight ratio (%)			
Day 8	1.34 ± 0.29	1.34 ± 0.31	>0.9
Day 30	1.67 ± 0.25	1.50 ± 0.31	0.1

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

Table 2 Pre-, per- and post-operative characteristics of recipients

Characteristics	Recipient of (R) liver without pre-conditionning *n* = 22 cases	Recipient of (R) liver with pre-conditionning *n* = 22 cases	*P*-value
Male/female (ratio)	17/5	18/4	>0.9
Age (years)	46.5 ± 13.6	47.6 ± 11.5	0.8
No. transplanted for			0.5
Cirrhosis	6	9	
Cancer	13	8	
Other	3	5	
Graft to body weight ratio (%)	1.14 ± 0.39	1.18 ± 0.31	0.7
Cold ischaemia time (minutes)	87 ± 31	92 ± 28	0.6
Warm ischaemia time (minutes)	68 ± 27	63 ± 27	0.6
Number of blood units transfused	4.5 ± 4.6	3.7 ± 3.5	0.9
Peak AST (IU/L)	290 ± 146	307 ± 189	0.4
Peak ALT (IU/L)	496 ± 343	437 ± 302	0.8
Minimum prothrombin time (% of normal)	36.4 ± 13.3	37.7 ± 8.5	0.7
Bilirubin day 7 (µmol/L)	107 ± 97	132 ± 104	0.4
Duration of stay (days)			
Overall	41.3 ± 21.3	35.7 ± 8.7	0.3
In intensive care unit	10.4 ± 5.4	12.0 ± 6.6	0.4
Morbidity n (%)	7 (31.8)	8 (36.4)	0.9
In-hospital mortality n (%)	2 (9)	1 (4.5)	0.5
Actuarial survival rate at 1 year (%)			
Patient	86.1	95.5	0.08
Graft	88.9	80.2	0.6

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

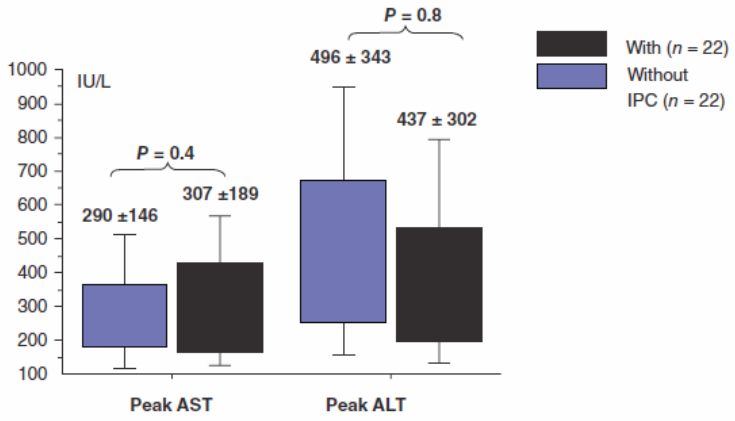


Figure 1 Ischaemia–reperfusion injury in the recipient after living related right lobe liver transplantation (LRRLLT)

in Group $_{Precond}$ had a similar peak AST concentration (307 ± 189 vs. 290 ± 146 IU/L, $P = 0.4$) and a similar peak ALT concentration (437 ± 302 vs. 496 ± 343 IU/L, $P = 0.8$) as patients in Group $_{control}$ (Fig. 1).

Factors associated with the maximum AST concentration within 10 days of transplantation

Factors potentially predictive of the maximum AST concentration in the recipient were assessed using univariate and multivariate

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

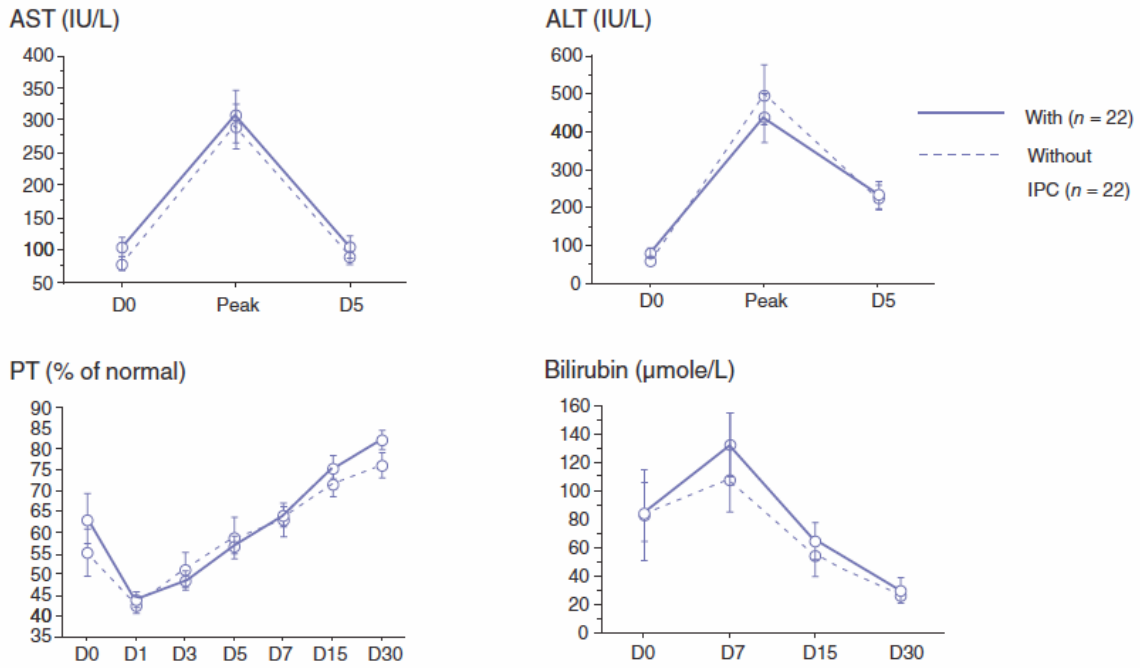


Figure 2 Post-living related right lobe liver transplantation (LRRLLT) liver function tests with versus without graft preconditioning. Comparision of groups was never statistically significant at any time point. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; PT, prothrombin time

analysis. The donor data included: age, pre-operative liver function tests, duration of operation, intra-operative blood loss, volume of autotransfusion and graft preconditioning; and the recipient data included: age, gender, pre-operative liver function tests, graft-to-recipient body weight ratio, CIT, WIT and transfusion volume.

Univariate analysis showed that only the pre-operative AST concentration in the recipient and the warm ischaemia time were associated with peak post-operative AST concentration ($P = 0.04$ and $P = 0.03$, respectively). Using multiple variable analysis none of the later factors remained independently significant.

Graft function and factors associated with the minimal prothrombin time

We found no significant difference in prothrombin time and bilirubin concentration between the two groups of recipients at any time point (Table 2, Fig. 2). Univariate analysis showed that the following factors were associated with the minimal prothrombin time: presence of cirrhosis ($P = 0.01$), the combination of female donor to male recipient ($P = 0.04$), graft to recipient body weight ratio ($P = 0.02$), number of blood units transfused in the recipient ($P = 0.02$), pre-operative bilirubin concentration in the recipient ($P = 0.002$), and recipient preoperative prothrombin time ($P = 0.006$). None of the other factors tested were significant, including preconditioning of the graft, CIT, and WIT (data not shown). In the multivariate analysis, graft-to-recipient body weight ratio ($P = 0.003$) and recipient pre-operative bilirubin concentration ($P = 0.004$) remained independently associated with the minimal prothrombin time.

Analysis of post-reperfusion biopsies

Analysis of post-reperfusion biopsies revealed no steatosis in any of the grafts. Liver biopsies revealed ischaemia–reperfusion injury in 2/20 (10%) and 4/19 (21%) of Group $_{\text{Precond}}$ and Group $_{\text{control}}$ patients, respectively ($P = 0.4$).

Recipient outcome (Table 2)

Two patients in Group $_{\text{control}}$ and one patient in Group $_{\text{Precond}}$ died within 60 days of transplantation ($P = 0.5$). Primary non function occurred in one case in Group $_{\text{control}}$ and none in Group $_{\text{Precond}}$ ($P = 0.9$). Technical morbidity occurred in 7/22 (31.8%) and 8/22 (36.4%) patients in Group $_{\text{control}}$ and Group $_{\text{Precond}}$, respectively ($P = 0.9$). The incidences of biliary complications (6/22 in Group $_{\text{control}}$ and 7/22 in Group $_{\text{precond}}$, $P = 0.9$), arterial thrombosis (3/22 and 0/22, $P = 0.2$) and hemoperitoneum requiring reoperation (3/22, and 0/22, $P = 0.2$) were similar in the two groups. We observed no cases of portal vein thrombosis or outflow occlusion.

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

The incidence of acute rejection needing increased immunosuppression was the same in Group $_{control}$ and Group $_{Precond}$ (4/22, and 1/22, $P = 0.3$).

The durations of stay in intensive care and in hospital were similar in the two groups ($P = 0.4$ and $P = 0.3$, respectively).

Retransplantation was performed in three cases in Group $_{control}$ (due to arterial thrombosis $n = 2$ and primary non-function $n = 1$) and none in Group $_{Precond}$ ($P = 0.2$). One patient from Group $_{control}$ who was on the waiting list for elective retransplantation for ischaemic cholangitis dropped out because of recurrent cancer.

Long-term survival

The mean follow-up period was 20.6 ± 14.4 months. Four patients in Group $_{control}$ and none in Group $_{Precond}$ ($P = 0.1$) died. These four deaths occurred 3, 14, 21 and 24 months after transplantation and were as a result of cancer recurrence (3 cases) and intracerebral haemorrhage (1 case). No difference in 1-year survival was found between the groups (86.1% and 95.5% for Group $_{control}$ and Group $_{Precond}$, respectively, $P = 0.08$, logrank). Actuarial graft survival rate was 88.9% and 80.2% at 1 year for Group $_{control}$ and Group $_{Precond}$, respectively ($P = 0.6$).

Discussion

This single centre prospective study involving 44 consecutive cases of elective adult-to-adult living related right lobe liver transplantation is one of the few studies[37,38] to evaluate the potential benefit of ischaemic preconditioning of the graft in this model.

Ischaemic preconditioning had no effect on graft tolerance to ischaemia–reperfusion injury, as shown by the similar peak AST concentrations in the two groups (Fig. 1, Table 2).

Two human studies have evaluated the preconditioning-like effect of reversible cardiac arrest in the cadaveric liver donor on the post-transplantation outcome.[26,27] Totsuka *et al.*[26] showed that livers from human donors who were resuscitated after cardiopulmonary arrest had similar survival and function to those from other donors. In addition, these authors showed that the post-transplantation serum concentrations of transaminases were lower in patients who received organs from donors with prior cardiopulmonary arrest compared with those without. Conversely, Wilson *et al.*[27] reported that reversible cardiac arrest prior to graft procurement did not trigger any preconditioning benefit in liver transplantation. These two studies, together with the large body of experimental evidence showing that ischaemic preconditioning protects against cold ischaemia–reperfusion injury, were the impetus for our study. The discrepancy between our disappointing results and previous results in favour of ischaemic preconditioning may be as a result of several factors. First, the occurrence of ischaemic preconditioning differs between different tissues within a given species and within the same tissue in different species.[8,39–47] Second, the many mechanisms beyond the scope of our study of ischaemic preconditioning[9,10,48] might be involved differently in different models. Third, biases in our study might mask any effect of ischaemic preconditioning. These biases include small graft size, the preconditioning protocol and the choice of study design. One of the biases could be the short cold ischaemia time (below 3 h in all our cases; median = 82 min). This potential bias, which remains to be proven, is however counterbalanced by the absence of an effect of preconditioning on ischaemia reperfusion subsequent to the warm ischaemia between portal and arterial revascularization (always >30 min, the cut-off value of clinical studies evaluating the value of IPC in warm ischemia during liver resection).[18,19] Pharmacological preconditioning protocols that do not include a warm ischaemia step (with portal triad clamping) might prevent this negative effect.[49–51]

Ischaemic preconditioning did not improve graft function, as shown by the similar prothrombin time and bilirubin concentration in the two groups at all time points of the study (Fig. 2). This is in accordance with the results of the two human studies that evaluated the preconditioning-like effect of reversible cardiac arrest in the cadaveric donor.[26,27] In these studies, post-transplantation prothrombin times and bilirubin concentrations were similar regardless of whether the donor had sustained temporary cardiac arrest prior to procurement or not. None of the animal studies on ischaemic preconditioning in cold ischaemia measured the coagulation factors and bilirubin levels after ischaemic preconditioning of the liver. However, Adam *et al.*[52] showed that preconditioning of the liver graft was associated with altered liver function compared with a control group in a rat model. In a randomized study, we showed that 10 min of ischaemic preconditioning of the whole liver in the cadaveric donor improved graft tolerance to ischaemia–reperfusion. However, this protective effect tended to alter graft function.[53] Conversely, Koneru *et al.*[54] showed in a randomized study that 5 min of ischaemic preconditioning of the whole liver in the deceased donor did not trigger any benefit in the recipient in terms of ischaemia–reperfusion injury and graft function.

The preconditioning protocol had neither a positive nor a negative effect on the outcome of liver transplantation. The clamping of the graft pedicule was not associated with an increased risk of portal or arterial thrombosis in the recipient. Interestingly, when comparing the two groups, only patients in the Group $_{control}$ appeared to require retransplantation. Besides the fact that this difference was statistically non-significant and purely attributable to technical problems (2 patients) or graft primary non-function (1 patient), we could not confidently confirm that the clamping of the graft pedicule is not associated with an increased risk of portal or arterial thrombosis in the recipient as our study was underpowered to demonstrate a difference in this criterion.

Likewise, ischaemic preconditioning of the graft had no effect on donor outcome. Ischaemic preconditioning had no effect on the post-operative concentration of transaminases or on liver function tests i.e. prothombin time and bilirubin concentration. However, it is worth noting that the absence in our study of any effect of ischaemic preconditioning of the graft can also be interpreted as results of an intervention which is already compensated

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

by advantages such as shorter transection time in LDLT donors, or healthy donors who have no underlying liver disease such as steatosis.

In addition, the results of this study differ from those reported by Arai *et al.* in a rat model.[23] In the study by Arai *et al.* ischaemic preconditioning of one half of an individual rat liver decreased non-parenchymal cell killing, used as an index of sinusoidal endothelial cell killing, not only on the preconditioned side but also on the contralateral side. This potential effect, termed heterologous preconditioning, which has also been observed in the heart model,[55] was not confirmed in the donors of our study.

Lastly, we also found that ischaemic preconditioning not only did not have any clinical impact on the recipients' outcome, but also that ischaemia–reperfusion injury was similar in the post-reperfusion biopsies of the patients belonging to the control and preconditioning group. However, our study did not provide any clinical information about the changes at a molecular level (such as over expression of IL1-Ra, Bcl-2 and NO), thought to be responsible for neutralizing the pro-inflammatory responses of interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) to ischaemia reperfusion.[56] Concerning the later changes (molecular) induced by ischaemia–reperfusion injury, we feel that newer prospective randomized studies in the same settings should be conducted to better evaluate their effects.

Conclusion

Ischaemic preconditioning of right hepatic lobe liver grafts in living donors does not seem to protect against ischaemia–reperfusion injury in the recipient. Ischaemic preconditioning of the graft did not have deleterious effects on graft function, or on morbidity or mortality rates. Ten minutes of ischaemic preconditioning had no consequence on the post-operative outcome of the donors. As donor safety and immediate and sufficient graft function are the primary goals of LRLT, the use of ischaemic preconditioning (ten minutes of warm ischemia) is not appropriate for living-related right liver transplantation.

Conflicts of interest

None declared.

References

1. Yamaoka Y, Washida M, Honda K, Tanaka K, Mori K, Shimahara Y *et al.* (1994) Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 57:1127–1130.
2. Todo S, Furukawa H, Jin MB *et al.* (2000) Living donor liver transplantation in adults: outcome in Japan. *Liver Transpl* 6:S66–S72.
3. Brown RS Jr, Russo MW, Lai M, Shiffman ML, Richardson MC, Everhart JE *et al.* (2003) A survey of liver transplantation from living adult donors in the United States. *N Engl J Med* 348:818–825.
4. Everhart JE, Lombardero M, Detre KM *et al.* (1997) Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality. *Transplantation* 64:1300–1306.
5. Sarasin FP, Majno PE, Llovet JM *et al.* (2001) Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: a life-expectancy and cost-effectiveness perspective. *Hepatology* 33:1073–1079.
6. Cheng SJ, Pratt DS, Freeman RB Jr *et al.* (2001) Living-donor versus cadaveric liver transplantation for non-resectable small hepatocellular carcinoma and compensated cirrhosis: a decision analysis. *Transplantation* 72:861–868.
7. Marcos A. (2000) Right lobe living donor liver transplantation: a review. *Liver Transpl* 6:3–20.
8. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124.
9. Carini R, Albano E. (2003) Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 125:1480–1491.
10. Jaeschke H. (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G15–G26.
11. Pang CY, Yang RZ, Zhong A *et al.* (1995) Acute ischemia preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 29:782–788.
12. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. (1997) Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 8:86–94.
13. Bonventre JV. (2002) Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:43–48.
14. Kirino T. (2002) Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1283–1296.
15. Du ZY, Hicks M, Winlaw D *et al.* (1996) Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 15:1258–1267.
16. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. (2001) Hepatic-ischemia reperfusion injury. *Am J Surg* 181:160–166.
17. Selzner N, Rüdiger H, Graf R, Clavien PA. (2003) Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125:917–936.
18. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. (2000) Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 232:155–162.
19. Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA *et al.* (2003) A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238:843–852.
20. Nuzzo G, Giugliante F, Vellone M *et al.* (2004) Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 10:S53–S57.
21. Cleveland JC, Raeburn C, Harken AH. (2001) Clinical applications of ischemic preconditioning: from head to toe. *Surgery* 129:664–667.
22. Raeburn CD, Cleveland JC, Zimmerman MA, Harken AH. (2001) Organ preconditioning. *Arch Surg* 136:1263–1266.
23. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. (2001) Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of non parenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 7:292–299.
24. Lloris-Carsis JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH *et al.* (1993) Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 25:3303–3304.
25. Kume M, Yamamoto Y, Saad S *et al.* (1996) Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 128:251–258.
26. Totsuka E, Fung JJ, Urakami A *et al.* (2000) Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation: possible role of ischemic preconditioning. *Hepatology* 31:577–580.

© 2010 International Hepato-Pancreato-Biliary Association

27. Wilson DJ, Fisher A, Das K *et al*. (2003) Donors with cardiac arrest: improved organ recovery but no preconditioning benefit in liver allografts. *Transplantation* 75:1683–1687.

28. Lee S, Park K, Hwang S *et al*. (2001) Congestion of right liver graft in living donor liver transplantation. *Transplantation* 71:812–814.

29. Sugawara Y, Makuuchi M, Sano K *et al*. (2003) Vein reconstruction in modified right liver graft for living donor liver transplantation. *Ann Surg* 237:180–185.

30. Calne RY, William R. (1968) Transplantation in man. I Observations on technique and organization in five cases. *Br Med J* 4:535–540.

31. Belghiti J, Panis Y, Sauvanet A *et al*. (1992) A new technique of side to side caval anastomosis during orthotopic hepatic transplantation without inferior vena caval occlusion. *Surg Gynecol Obstet* 175:271–272.

32. Adam R, Reynes M, Johann M *et al*. (1991) The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 23:1538–1540.

33. Heymsfield SB, Fulenwider T, Nordlinger B, Barlow R, Sones P, Kutner M. (1979) Accurate measurement of liver, kidney, and spleen volume mass by computerized axial tomography. *Ann Intern Med* 90:185–187.

34. Henderson JM, Heymsfield SB, Horowitz J, Kutner MH. (1981) Measurement of liver and spleen volume by computed tomography. *Radiology* 141:525–527.

35. Van Thiel DH, Hagler NG, Schade RR *et al*. (1985) In vivo hepatic volume determination using sonography and computed tomography. *Gastroenterology* 88:1812–1817.

36. Demetris A, Batts K, Dhillon A, Wight D, Williams J, Yamabe H. (1997) Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 25:658–663.

37. Miller CH, Masetti M, Cautero N *et al*. (2004) Intermittent inflow occlusion in living liver donors: impact on safety and remnant function. *Liver Transpl* 10:244–247.

38. Testa G, Angelova V, Laricchia-Robbio L *et al*. (2009) Unilateral ischemic preconditioning and heterologous preconditioning in living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 24:334–340.

39. Park KM, Chen A, Bonventre JV. (2001) Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MARK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 276:1870–1876.

40. Turman MA, Bates CM. (1997) Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 19:47–60.

41. Berhends M, Walz MK, Kribben A *et al*. (2000) No protection of the porcine kidney by ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 85:819–827.

42. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. (2000) Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 85:1007–1013.

43. Arend LJ, Thompson CI, Spielman WS. (1985) Dypiramidol decreases glomerular filtration in the sodium-depleted dog. Evidence for mediation by intrarenal adenosine. *Circ Res* 56:242–251.

44. Kosieradzki M, Ametani M, Southard JH, Mangino MJ. (2003) Is ischemic preconditioning of the kidney clinically relevant? *Surgery* 133:81–90.

45. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A *et al*. (1999) Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic renal failure in the rat. *Ren Fail* 21:135–145.

46. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD *et al*. (1997) Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 79:842–847.

47. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G. (2001) Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci* 69:1–15.

48. Sakon M, Ariyoshi H, Umeshita K, Monden M. (2002) Ischemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-dependent mechanisms. *Surg Today* 32:1–12.

49. Mokuno Y, Berthiaume F, Tompkins RG *et al*. (2004) Technique for expanding the donor liver pool: heat shock preconditioning in a rat fatty liver model. *Liver Transpl* 10:264–272.

50. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R *et al*. (2004) Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 135:203–214.

51. Klein M, Geoghegan J, Wangemann R *et al*. (1999) Preconditioning of donor livers with prostaglandin I2 before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67:1128–1132.

52. Adam R, Arnault I, Bao YM, Salvucci M, Sebagh M, Bismuth H. (1998) Effect of ischemic preconditioning on hepatic tolerance to cold ischemia in the rat. *Transpl Int* 11:S168–S170.

53. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R *et al*. (2005) Effects of ten minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the Ying and the Yang. *Ann Surg* 242:133–139.

54. Koneru B, Fisher A, He Y *et al*. (2005) Ischemic preconditioning in deceased donor liver trnsplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl* 11:196–202.

55. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M *et al*. (1993) Regional 'ischemic preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87:893–899.

56. Barrier A, Olaya N, Chappini F *et al*. (2005) Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion. *FASEB J* 19:1617.

II. Etude des mécanismes de tolérance à la mort hépatocytaire dans la stéatose impliquant de nouvelles cibles moléculaires

II-1. Revue de la littérature sur l'utilisation des approches moléculaires à haut débit pour l'étude de la pathogenèse et l'identification de marqueurs précoces des hépatopathies non-alcooliques

Article 5: Human Non-Alcoholic SteatoHepatitis: new insights from OMICS studies.

Martel C, **Degli Esposti D**, Bouchet A, Brenner C*, Lemoine A*.

* Ces auteurs ont contribué également à ce travail

Soumis pour publication

Cet article fait une revue de la littérature sur les travaux de « omic » réalisés sur des tissus humains présentant une hépatopathie non-alcoolique. Il rassemble notamment les études de transcriptomique précédemment effectuées au sein du laboratoire sur des foies stéatosiques. Cette revue présente l'intérêt de décrire de nouvelles voies de tolérance à la mort dans les maladies inflammatoires du foie.

Notre équipe a conduit des études de transcriptomique sur des foies stéatosiques et sur des foies soumis à une preconditionnement ischémique (Chiappini et al 2006, Barrier et al 2005; Navarro-Sabate et al, 2006). Les résultats obtenus ont montré l'expression spécifique de gènes qui contrôlent différentes voies métaboliques : 1) la régulation du cholestérol intracellulaire et du trafic des membranes; 2) la beta-oxydation mitochondriale des acides gras à long chaine ; 3) l'adressage des acides gras libres vers les voies biosynthétiques des phospholipides ; 4) le contrôle de l'adipogenèse ; 5) un stress oxydatif et des mécanismes de mort et survie cellulaires

Ces résultats viennent conforter ceux de la littérature utilisant des techniques de protéomique et de lipidomique (Puri et al, 2007, Puri et al 2009 , Le Naour et al 2009). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les résultats de ces articles récents convergent vers une nouvelle hypothèse d'une balance entre « lipides toxiques » et « lipides protecteurs » dans la NASH. En effet, il semble exister un état très dynamique, mais difficilement détectable en histologie, caractérisé par un trafic des acides gras et leurs dérivés. Ce trafic aurait pour conséquence l'activation de systèmes

permettant de rétablir l'homéostasie lipidique et protéger le foie d'une éventuelle lipotoxicité (Neuschwander-Tetri 2010).

La découverte de nouvelles voies contrôlant l'homéostasie intracellulaire des lipides et de leurs métabolites, notamment l'autophagie qui régulerait finement le recyclage des vésicules lipidiques, permettra l'identification de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques.

Bentham Science Publishers

Current Pharmaceutical Biotechnology

URL: http://www.bentham.org/cpb

Title of Manuscript: **Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies**

Author(s): **Martel Cécile[1,2], Degli Esposti Davide[1,3], Bouchet Antonin[1], Brenner Catherine[2*], Lemoine Antoinette[1,3,4*]**

(*: share senior leadership)

[1]Inserm U1004; Université Paris-Sud 11; Institut André Lwoff; PRES Universud-Paris, 12-14 Avenue Paul Vaillant Couturier; 94800 Villejuif; France

[2]Inserm UMR S-769, Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud 11, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry, France

[3]Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

[4]AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire; 14 Avenue Paul Vaillant Couturier; 94804 Villejuif Cedex; France

Principal/Corresponding author:

Name 1: BRENNER Catherine

Add/ Affiliation Inserm UMR S-769, Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud 11, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry, France

Tel: 33 1 46 83 52 42

e-mail 1: catherine.brenner-jan@u-psud.fr

e-mail 2: catherinebrenner@yahoo.com

Name 2: LEMOINE Antoinette

Add/ Affiliation**:** Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire; 14 Avenue Paul Vaillant Couturier; 94804 Villejuif Cedex; France

Tel: 33 1 45 59 36 93

Fax: 33 1 45 59 36 25

e-mail 1: antoinette.lemoine@pbr.aphp.fr

e-mail 2: antoinette.lemoine@u-psud.fr

Title: **Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies**
Title page: **steatohepatitis and omics**

Abstract (219 words)
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver pathology characterized by fat accumulation in a context of metabolic syndrome or insulin resistance. It can be associated with obesity, diabetes, hyperinsulinemia, dyslipidemia as well as hypertension. NAFLD consists of a large spectrum of hepatic lesions including benign steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Upon chronic stress, NASH would occur *via* a "two-hits" process involving modulation of a high number of genes and proteins. Firstly, the accumulation of fat, either due to the increased inflow of free fatty acids or *de novo* lipogenesis, leads to steatosis. Secondly, when adaptive mechanisms for stress tolerance are overwhelmed, lipotoxicity and chronic inflammation trigger major hepatic damages, mainly *via* oxidative and inflammatory stress, lipid peroxidation and cell death. As a consequence, all these processes concur to favor steatohepatitis, fibrosis and cancer. Recently, the elucidation of physiopathological signaling cascades controlling NAFLD and NASH benefited from large-scale studies, namely the omics, such as transcriptomics, genomics, proteomics, and lipidomics. The advent of lipidomics would allow shedding light upon the respective roles of triglyceride and fatty acid metabolites in the lipotoxic liver injury hypothesis for the pathogenesis of NASH. In this review, the contribution of the omics to the understanding of the molecular basis of NASH is discussed that could offer perspectives for novel biomarkers discovery.

Keywords: biomarker, inflammation, liver, mitochondria, NAFLD, omics

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) constitutes a major public health concern because it affects approximately 10-20% of the population in developing countries and its prevalence is constantly rising. NAFLD includes successive stages of increasing severity: steatosis, inflammation (*i.e*. hepatitis or non-alcoholic steatohepatitis (NASH)), fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). It is associated with metabolic syndrome (*e.g*. obesity, combined hyperlipidemia, type II diabetes mellitus and high blood pressure) or insulin resistance. Abnormalities in fatty acid metabolism and systemic inflammation are key factors involved in the development of insulin resistance, dyslipidemia and cardiovascular risk factors. However, factors that link metabolic syndrome to the onset and progression of liver injury are poorly understood [1].

Steatosis, characterized by an accumulation of triglycerides in the liver parenchyma, is the hallmark of NAFLD. It occurs when the rate of hepatic uptake of circulating blood free fatty acids (FFA), which originates from excessive adipose tissue lipolysis and *de novo* liver lipogenesis from glucose is greater than the rate of mitochondrial fatty acids oxidation or export as triglycerides within low density lipoproteins. It

ensues major alteration in glucose, fatty acid and lipoprotein metabolism with the development of insulin resistance. However, emerging data now provide convincing evidence that triglyceride accumulation in the form of lipid droplets could rather be a parameter of excessive fatty acid trafficking while nontriglyceride fatty acid metabolites would be the culprit of lipotoxicity of the NASH pathogenesis [2]. Insulin resistance favors an excessive flow of fatty acids from adipose tissue and also impairs peripheral glucose disposal. Fatty acid disposal in the liver occurs through oxidative pathways with excessive production of reactive oxygen species and subsequent lipid peroxidation and inflammatory response. Importantly, macrophages present in adipose and liver tissues of obese patients release high levels of chemokines, which cause inflammation and insulin resistance. Then, innate immune activation is central to the development of obesity-related insulin resistance and tissue damage, such as that observed in atherosclerosis.

In 1998, a "two-hit" model has been proposed for the development of NAFLD [3]. The "first hit" corresponds to a primary hepatic lipid accumulation, the "second hit" consisting in an oxidative stress leading to liver injury and inflammation. Clinical investigation of patients with NASH revealed that mitochondria present morphologic and functional abnormalities, suggesting a central role in pathogenesis via altered fat metabolism and excessive production of reactive oxygen species (ROS) [4,5]. Indeed, mitochondria are the site for free fatty acids β–oxidation and are responsible for the ATP production by oxidative phosphorylation. Thus, in NASH, dysfunction of the mitochondrial respiratory chain results in enhanced ROS production, ATP depletion and lipid peroxidation [2,6,7].

However, other molecular mechanisms have been proposed to modulate hepatic lipid accumulation and inflammation. Thus, there is strong evidence that some cytokines, like TNFα and Il-1□ are also involved in the pathogenesis of NASH by disturbing the mitochondrial respiratory chain, increasing ROS and cell resistance to insulin, amplifying proinflammatory cytokines production and ultimately, provoking cell death by apoptosis and/or necrosis [8,9]. Chemokines, adipokines and hormones have been largely described in the pathogenesis of steatosis and its evolution towards NASH, cirrhosis or HCC [10]. Finally, another emerging mechanism is endoplasmic reticulum (ER) response to stress, the organelle responsible for protein folding, maturation, and secretion, in relation with the lipid and glucose metabolisms. Thus, ER stress pathway can intersect with inflammation to manage a metabolic dysfunction [11]. Both are short-term adaptive responses contributing to the function and survival of organism, and are detrimental when chronically engaged.

Treatment of NAFLD remains difficult. Apart from a hypocaloric diet and physical exercise, alcohol withdrawal and vitamins, no treatment has shown any efficacy in the prevention of these diseases yet [1]. Few molecules can improve liver steatosis and inflammation, and no treatment for fibrosis is available. Bariatric surgery, which improves the survival of obese patients, may reduce liver steatosis and inflammation, but not fibrosis [12,13]. Therefore, it is important to identify the biological targets and signaling pathways that underlie the pathogenesis of NASH and distinguish it from steatosis. It will be also important to identify patients with NASH who will evolve towards fibrosis, and/or hepatocellular carcinoma. The identification of such targets will allow the development of biomarkers to diagnose, prevent, and/ or treat patients.

Large-scale studies, such as transcriptomics, genomics, proteomics, lipidomics and metabolomics (*i.e.* omics) may offer interesting insights into the pathophysiological mechanisms of NAFLD. Thus, systematic investigation of a large number of genes and proteins can help to identify novel molecular pathways that are active in NAFLD and related to its progression. In this review, the contribution of the omics to the understanding of the molecular basis of NASH is overviewed and their respective contributions for the discovery of novel biomarkers are discussed. We have focused on omics performed in human samples that could open ways to target new diagnostic or therapeutic tools.

Genomics

Since the completion of the Human Genome Project in 2003, genome-wide association studies (GWAS) have been developed to rapidly search biomarkers across genomes of population to identify genetic variations associated with a particular disease. The hypothesis-free approach of the GWAS has the advantage of interrogating genes that otherwise would have not been considered as candidates due to our limited understanding of their function, and may also uncover important regulatory variation within the large regions of the genome that do not contain protein-coding genes. Few GWAS comparing populations with NAFLD or NASH have been performed in patients with microarrays spotted with single nucleotide polymorphisms (SNPs). For instance, Yuan *et al*. [14] conducted a GWAS to study genetic variations influencing plasma liver enzyme levels in three populations (total n = 7,715) with replication in three additional cohorts (total n = 4,704). This study highlighted six loci influencing plasma levels of liver enzymes and confirmed the previously reported associations between the *GGT1* locus and gamma glutamyl transpeptidase (GGT) levels and between the *ABO* locus and alkaline phosphatase levels. In addition, Romeo *et al*. [15] reported the relationship between a genome-wide survey of 9,229 non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) and hepatic fat detected by MR spectroscopy in 1,032 African-American, 696 European-American, and 383 Hispanic adults residing in Dallas County. Variation in *PNPLA3* (the patatin-like phospholipase 3 gene) contributed to ethnic and inter-individual differences in hepatic fat content and susceptibility to NAFLD. An allele in *PNPLA3* (rs738409; I148M) was strongly associated with increased hepatic fat levels and with alanine aminotransferase levels. This variant has been recently confirmed to play a major role in NASH progression due to its association to fibrosis development [16]. More recently, Chalasani *et al*. [17] have analyzed 324,623 SNPs from the 22 autosomal chromosomes in 236 non-Hispanic white women with NAFLD well characterized for their clinical and histological features of NAFLD. Specific genetic variants were associated with features of hepatic histology in patients such as NAFLD activity score (*e.g.* SNP rs2645424 on chromosome 8 in farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1 (*FDFT1*)) or lobular inflammation (SNP rs1227756 on chromosome 10 in a collagen XIII variant, *COL13A1*). Some others are associated with the degree of fibrosis or serum levels of alanine aminotransferase. However, no significant association was reported between genotypes and steatosis, ballooning degeneration, portal inflammation, or other features of NAFLD.

Altogether, this limited number of studies suggests that some genetic determinants, in particular those linked to lipid metabolism, may correlate with an increased susceptibility to NAFLD progression. However, further studies are required to really improve our knowledge in genomics impact on the pathogenesis of NAFLD. Such results could help in the prevention of progression or treatment at each step of the disease.

Transcriptomics

The advent of a family of transcriptomic tools, mainly real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and microarrays, together with supporting informatics and statistical procedures have permitted robust analyses of global mRNA expression changes in NAFLD. The first use of high-density synthetic oligonucleotide microarray analysis (Hu6800 GeneChip, Affymetrix, CA) in histologically progressive non-alcoholic steatohepatitis pointed out an involvment of genes affecting mitochondrial function and insulin sensitivity [18]. The global hepatic gene expression was determined in six patients with NASH and compared to six healthy controls. The study also included two groups of patients with cirrhosis caused by hepatitis C or cirrhosis secondary to primary biliary cirrhosis. Among the modulated genes, a significant decrease of mRNA levels of mitochondrial anti-oxidant defense genes or genes involved in metabolism like methylglutaryl coenzyme A, glucose-6-phosphatase, acyl CoA synthetase, oxoacyl CoA thiolase was observed, whereas an increased expression of genes that might be deleterious for patient insulin sensitivity was detected (*e.g.* complement component C3 and hepatocyte-derived fibrogen-related protein) [18].

The profiling of hepatic gene expression using microarray hybridizations and qRT-PCR in 98 bariatric surgery patients classified as normal, steatosis alone, steatosis with nonspecific inflammation, and NASH was performed [19]. Several genes were differentially expressed underscoring the implication of multiple molecular pathways. Sets of genes segregated steatosis alone and obese controls (seven genes), steatosis with unspecific inflammation *versus* obese controls (three genes), and NASH *versus* obese controls (14 genes). An overall down regulation of phase II detoxification enzymes was observed at earlier stages of NAFLD (steatosis alone) as well as a down regulation of Mu-class glutathione S-transferases, enzymes involved in the cellular defense against oxidative stress as expected from above study. NASH progression was associated to an up-regulation of genes related to the activation of stellate cells and fibrogenesis as suggested previously [20] and to liver regeneration and/or hepatocyte survival in patients with steatosis alone (*e.g.* FGFR2 gene at earlier stages of NAFLD). The expression of type II keratins KRTHB6/B3, proteins probably involved in protection or stimulation of inflammation was also enhanced [21]. Moreover, Younoussi *et al*. [19] performed pairwise comparisons between the NAFLD groups including NASH *versus* steatosis, NASH *versus* steatosis with unspecific inflammation, steatosis *versus* steatosis with unspecific inflammation, and NASH *versus* non NASH-NAFLD. Interestingly, only the NASH *versus* steatosis comparison yielded significantly differentially expressed genes. The first is IGFBP1 that was down-regulated in NASH patients, the second, FACL4, acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, were up-regulated.

The mechanism responsible for the development of steatosis has been assessed by our laboratory/team using high-density microarrays (22.3K) in nine normal and nine steatotic human liver samples without histological signs of inflammation or fibrosis. Interestingly, we have shown that with unsupervised classification (no gene selection) all steatotic livers clustered together showing the genetic homogeneity of the pathology [22]. One hundred and ten genes were found significantly differentially expressed, 100 being up-regulated in steatosis. Among this list, the occurrence of several genes of mitochondrial oxidative phosphorylation and oxidative metabolism suggest that modulation of mitochondrial function is an early hallmark of steatosis. However, significant increase of several inflammatory genes expression (i.e. IL-1 receptor family, TGF□), confirmed by qRT-PCR and immunohistochemistry, indicated the onset of the modulation of inflammation.

Recently, specific microarrays, namely muParaflo microRNA microarrays, allowed the investigation of microRNAs in NAFLD. MicroRNAs are non-protein-coding small single stranded RNAs that regulate gene expression via mRNA degradation or translation inhibition and their role in the NASH pathogenesis was not known. Cheung *et al*. have studied in 25 liver biopsies with NASH and 25 normal controls the expression of 474 microRNAs in NASH and their role in the genesis of the disease [23]. A total of 23 microRNAs were under-regulated whose targets were described to affect cell proliferation, protein translation, apoptosis inflammation, oxidative stress and metabolism. The authors focused their interest on miR-122, which is the most abundant miRNA in the liver and known to target hepatic lipogenic genes expression [24]. They further validated the implication of miR-122 by silencing as well as overexpression experiments in HCC cells, such as HepG2 and HUH7. Thus, its down-regulation could contribute to altered lipid metabolism in NASH.

Several transcriptomics studies have also been performed in animal or cellular models, most of them confirming the activation of genes encoding proteins involved in lipid metabolism, regulation of metabolic and cellular process, and G-protein coupled receptor protein signalling and inflammatory responses [25-27]. De Gottardi *et al*. performed microarrays gene chips and qRT-PCR of immortalized human hepatocytes treated or not with 50 □M oleic acid for seven days [28]. Gene expression analysis showed significant alterations in the transcription of two major classes of genes. The first one is involved in the cholesterol and fatty acid biosynthesis with an increased production of triglycerides in steatosis while synthesis of cholesterol is decreased; the second one is involved in apoptosis activation and cell proliferation suppression. Interestingly, no detectable change in genes associated with insulin resistance was observed in steatotic immortalized human hepatocytes, suggesting that this model is consistent for the study of lipid accumulation and steatosis independently of insulin sensitivity modulation.

Proteomics

A modest number of proteomic studies in samples of patients with NAFLD have been performed probably due to technical and ethical limitations, such as the quantity of tissues required. Most of them have been performed in animal or cell lines studies [29-31]. In humans suffering from NAFLD, proteomic techniques have been applied to serum of patients suffering of NASH leading to (i) the establishment of a list of proteins whose expression is changing during the progression of the disease, (ii) the identification of predictive

biomarkers and (iii) diagnosis. Thus, in addition to gene expression profiles (see "genomics") Younossi *et al*. (2005) generated protein expression profiles for the same cohorts of liver biopsies using SELDI-TOF mass spectrometry and two chip chemistries [19]. Changes in twelve proteins have been observed although none of them corresponded to the differentially expressed genes studied in the same samples. In addition, a biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH) based on proteins associated with apoptosis and adipocytokines was established, providing basic knowledge on the NASH pathogenic mechanisms and a clinically-relevant diagnosis assay [32]. More recently, a study revealed also the interest of phosphoproteomics in visceral tissue of 167 NAFLD patients using reverse phase protein microarrays [33]. The authors have designed 3 types of models (clinical, proteomic, and combination) to identify the activated or deactivated state of the incriminated kinase-driven signaling cascade. NASH was predicted by the variations of components of the insulin signaling pathway, especially the phosphorylation of the glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) as well as the two subunits of cyclic AMP regulated protein kinase A (PKA). By contrast, predictions based on phosphoproteomics were less reliable for fibrosis. Therefore, these results confirm the major role of the AKT kinase and insulin signaling pathway in the development of NASH and highlight promising predicting biomarkers.

Other studies have searched for serum markers of steatosis and NASH in obese non-alcoholic patient candidates to bariatric surgery. Comparison of serum protein profiles according to liver lesions identified double charged ions of alpha- and beta-haemoglobin subunits, the intensity of which significantly increased according to the severity of the liver lesions. Interestingly, these proteins returned to normal after bariatric surgery [34]. By contrast, an independent study failed to find proteins to distinguish between simple steatosis and NASH, using the MALDI TOF-MS technology in 80 patients with NAFLD and 19 healthy controls, showing the limits of the approach [35]. Recently, Bell *et al*., have used liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS) to explore the serum proteome of 69 patients with simple steatosis, NASH, NASH with advanced fibrosis and 16 healthy patients [36]. They identified over 1,700 proteins, the changes of 55 or 15 of them being significant between the simple steatosis and NASH F3/F4 group and the NASH and NASH F3/F4 group, respectively. According to transcriptomics studies, identified proteins belonged to immune system regulation and inflammation, coagulation, cellular and extracellular matrix structure and function.

Therefore, although proteomic studies reveals information on the pathogenesis and progression of the disease, currently, they do not have major clinical value to diagnose NASH or discriminate NASH and steatosis.

Lipidomics

It is well accepted that steatosis is the consequence of accumulation of triacylglycerols (TAG) and diacylglycerols (DAG) in the liver and that free fatty acid-induced lipotoxicity plays a pivotal role in the pathogenesis of NAFLD. They are the consequences of three sources, in particular the excessive postprandial lipolysis within an enlarged adipocyte mass typically observed in insulin resistant states. Minor sources are

dietary fat and *de novo* lipogenesis in the hepatocyte [37,38]. However, the patterns of fat distribution within tissues or the types and amounts of the intracellular lipids, especially the chain length and degree or location of desaturation, and their relationship to histological severity and metabolic parameters are unknown. Fat distribution is mostly abdominal, limb, truncal, and also dorsocervical. Interestingly, generalized obesity or waist circumference has been shown to contribute modestly to severity of steatohepatitis by contrast to dorsocervival lipohypertrophy [39]. It was, however, associated with severity of lobular inflammation and pericellular fibrosis. The amounts and types of lipids that accumulate in NAFLD are not fully defined and emerging data show that nontriglyceride fatty acid metabolites could play a central role in the pathogenesis of NASH whereas triglycerids could be relatively inert [1,40]. Indeed, fatty acids can give rise to metabolites that include desaturated products, elongation products, diacylglycerids, phospholipids, ceramides, sphingolipids, eicosanoids, oxidized- and nitrated-lipids. All of them may impact the genesis of stress and ROS within the endoplasmic reticulum and mitochondria, disrupt cell membrane integrity, alter pathways of cell signaling and thus modulate the death or the survival of hepatocytes or other liver cells [40,41]. They could influence the mechanistic aspects of injury, repair, and fibrogenesis that ultimately determine whether lipotoxic liver injury leads to cirrhosis. For example, lysophosphatidylcholine content increases in the liver specimens from NASH patients, and lysophosphatidylcholine administration induced hepatitis *in vivo* [42]. Therefore, given the important biological activities of many lipids, such information could provide potential insights into the pathophysiology of NAFLD and the metabolic syndrome. By using a lipidomic approach based on the study of hepatic lipids by capillary gas chromatography in fine needle liver biopsies of subjects with and without histological proven NAFLD or NASH, Puri *et al*. (2007) showed that the total hepatic lipid content was markedly increased in NAFLD and NASH, especially the TAG and the DAG content. Indeed, there was a stepwise increase in the mean TAG/DAG ratio from normal livers to NAFLD to NASH with a similar increase in free cholesterol and decrease in phosphatidylcholine [43]. Thus, they corroborated the existing evidence that increased TAG accumulation is the hallmark of NAFLD [38,44]. However, the FFA content did not increase in either NAFLD or NASH although it is believed that elevated FFA in the liver is the major cause of cell injury in NASH [45,46]. The decrease of phosphatidylcholine suggested that it may contribute to the observed increase in DAG along with lipogenesis. The increase of free cholesterol with unchanged levels of esterified cholesterol in NAFLD and NASH could contribute to the cellular toxicity of hepatocytes since free cholesterol has been described to be highly cytotoxic [47]. Toxicities could be related to mitochondrial abnormalities and impaired ATP synthesis [48-50], as well as the relative depletion of n-3 fatty acids, which increases 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity [51].

Puri *et al*. (2009) have applied similar technology to quantify the absolute and relative amounts of different lipid classes and characterize the plasma lipidome in 25 NAFL and 50 NASH subjects, compared with 50 lean normal controls [52]. The description of plasma lipid signatures at various stages of the disease may help to characterize the lipid traffic and metabolism and the role of specific metabolites and pathways in the pathogenesis of NASH. Compared with lean normal controls, the total plasma fatty acids as well as the total saturated fatty acids were increased in both NAFLD and NASH but reached significance only for NAFLD.

Interestingly, monounsaturated fatty acids were increased significantly in both NAFLD and NASH, probably due to increased levels of palmitoleic (16:1 n7) and oleic (18:1 n9) acids. The total polyunsaturated fatty acid levels were not significantly different across the three groups. Given the higher degree of toxicity attributed to saturated fatty acids compared to monounsaturated fatty acids [40,41], these results raise the question whether these changes constitute evidence of an adaptive response to increased fatty acid traffic in NAFLD. Among the lipid classes measured, DAG and TAG were significantly increased in subjects with NAFL and NASH compared with normals, as previously observed in the liver [43]. By contrast, the levels of FFA, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, and cholesterol ester were not significantly different between the study groups. Overall, the findings support the presence of increased lipogenesis, desaturases activities and relative activation of lipoxygenase pathway in NAFLD with a relative abundance of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) from normal through NASH and little change in the levels of cyclooxygenase-generated prostaglandins. This observation lends support to the existence of a state of increased proinflammatory lipid production rather than anti-inflammatory (e.g., lipoxin) products of lipoxygenase pathway. Of note, the data also provide new evidence for impaired peroxisomal polyunsaturated fatty acid metabolism in subjects with progression to NASH with an increase in plasma docosapentaenoic acid (DPA), a decrease in docosahexaenoic acid (DHA), which is synthesized in peroxisomes from DPA and lowered levels of plasmalogen lipids, that are also synthesized in peroxisomes. These results suggest the role of an impaired catabolism of fatty acids via the peroxisomal pathway in the progression to NASH whereas peroxisomal β-oxidation of fatty acids has been viewed as a peroxisome proliferator activated receptor α–activated protective response to fatty acid overload in the liver [52-54].

The intracellular traffic of lipids has also been described by the use of sophisticated technologies that could have an impact in NAFLD. Debois *et al*. (2009) have used time-of-flight-secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) with a bismuth cluster ion source to map lipids within liver biopsies of several patients suffering from NAFLD [56]. This technique revealed the accumulation of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, fatty acids and myristic acid in small vesicles with dramatic vitamin E depletion. There was also a selective macrovacuolar localization of cholesterol in steatosis areas of fatty livers compared to control livers. Moreover, a careful scrutiny of the ion images have exhibited very subtle differences in lipid localizations, depending on alkyl acid chain lengths of diacylglycerols and fatty acids, which were not characterized by the histological control performed on serial tissue sections [56]. Using both synchrotron FTIR (Fourier transform infrared) and ToF-SIMS microspectroscopies, Le Naour *et al*. (2009) described that DAG species C30, C32, C34 and C36 carrying at least one unsaturated alkyl chain were selectively concentrated into the steatotic vesicles, a selective and an enrichment in cholesterol as well as in DAG species carrying long alkyl chains in steatotic vesicles [57]. Indeed, DAG C36 species as well as unsaturated lipids were selectively localized inside the steatotic vesicles whereas DAG C30 species were detected mostly outside. Investigations performed on the non-steatotic part of the fatty livers have revealed important changes when compared to the normal liver.

Lipidomics have opened a new area in the comprehension of the pathophysiology of NAFLD but still require further studies in the perspective of biomarker discovery. It would allow the identification of important fatty acid derivatives and the understanding of lipotoxic diseases of the liver but also heart, pancreatic islets, and vasculature.

Conclusion

In conclusion, the above-described omics studies in cohorts of patients confirmed that NAFLD and NASH are very complex diseases involving the accumulation and traffic of various lipids in the liver and triggered inflammation responses. Transcriptomics, proteomics and lipidomics converge to provide evidence that the earliest detectable pathogenic mechanisms are (i) mitochondrial energetic and structural dysfunction, (ii) activation of inflammation via multiple targets and (iii) lipotoxicity. In comparison, hepatocyte death appears to be a late consequence of the progression of the disease. Then, hepatocyte death appears to be a key component of hepatic damage processes. In the perspective of biomarker discovery, only a limited number of studies found a potential application in the field of diagnosis. This can be explained by the cost, the difficulty to analyze large cohorts of patients and the sophistication of data analysis. However, there is an urgent need of accurate diagnosis to help the clinician to stratify the risk of patients identified with NAFLD to evolve towards NASH and HCC, but only the future will tell us if the results will be the height of the hope raised by omics.

List of abbreviations:

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis
HCC: Hepatocellular Carcinoma
ROS: Reactive Oxygen Species
FFA: Free Fatty Acids
ER: Endoplasmic reticulum
GWAS: Genome-Wide Association Studies
TAG: triacylglycerols
DAG: diacylglycerols

There are no conflict of interest

Acknowledgments

The work of CB is supported by le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR-08PCVI-0008-01). CB is also supported by l'Institut National pour le Cancer (INCa, 2008-1-PL BIO-04-CNS ON1) and l'Université Paris Sud (Programme Attractivité). The work of AL and DDE has been supported by NRB-Vaincre le Cancer and Groupement Coopératif de Transplantation de l'Ile de France (GCIF).

References

1. Anderson, N.; Borlak, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. Pharmacol. Rev., 2008, 60(3), 311-357.

2. Neuschwander-Tetri, B.A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology, 2010, 52(2), 774-788.

3. Day, C.P.; James, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology, 1998, 114(4):842-845.

4. Pessayre, D.; Fromenty, B.; Mansouri, A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 2004, 16(11), 1095-1105.

5. Vendemiale, G.; Grattagliano, I. ; Caraceni, P. ; Caraccio, G. ; Domenicali, M. ; Dall'Agata, M. ; Trevisani, F. ; Guerrieri, F. ; Bernardi, M. ; Altomare, E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. Hepatology, 2001, 33(4), 808-815.

6. Peralta, C.; Bartrons, R.; Serafin, A.; Blázquez, C.; Guzmán, M.; Prats, N.; Xaus, C.; Cutillas, B. ; Gelpí, E. ; Roselló-Catafau, J. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Hepatology, 2001, 34(6), 1164-1173.

7. Videla, LA.; Rodrigo, R. ; Araya, J.; Poniachik, J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic. Bio.l Med., 2004, 37(9), 1499-1507.

8. Malhi, H.; Gores, G.J.; Lemasters, J.J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1), S31-44.

9. Malhi, H.; Guicciardi, M.E. ; Gores, G.J. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiol. Rev., 2010, 90(3), 1165-1194.

10. Page, J.M.; Harrison, S.A. NASH and HCC. Clin. Live.r Dis., 2009, 13(4), 631-647.

11. Hummasti, S.; Hotamisligil, G.S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. Circ. Res., 2010, 107(5), 579-591.

12. Chavez-Tapia, N.C. ; Tellez-Avila, F.I. ; Barrientos-Gutierrez, T.; Mendez-Sanchez, N. ; Lizardi-Cervera, J. ; Uribe, M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. Cochrane Database Syst. Rev., 2010, (1), CD007340.

13. Shaffer, E.A. Bariatric surgery: a promising solution for nonalcoholic steatohepatitis in the very obese. J. Clin. Gastroenterol., 2006, 40(Suppl 1), S44-50.

14. Yuan, X.; Waterworth, D.; Perry, J.R.; Lim, N.; Song, K.; Chambers, J.C.; Zhang, W.; Vollenweider, P.; Stirnadel, H.; Johnson, T.; Bergmann, S.; Beckmann, N.D.; Li, Y.; Ferrucci, L.; Melzer, D.; Hernandez, D.; Singleton, A.; Scott, J.; Elliott, P.; Waeber, G.; Cardon, L.; Frayling, T.M.; Kooner, J.S.; Mooser, V. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. Am. J. Hum. Genet, 2008, 83(4), 520-528.

15. Romeo, S.; Kozlitina, J.; Xing, C.; Pertsemlidis, A.; Cox, D.; Pennacchio, L.A.; Boerwinkle, E.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat. Genet., 2008, 40(12), 1461-1465.

16. Krawczyk, M.; Grünhage, F.; Zimmer, V.; Lammert, F. Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. J. Hepatol., 2010, Dec 16. [Epub ahead of print]

17. Chalasani, N.; Guo, X.; Loomba, R.; Goodarzi, MO.; Haritunians, T.; Kwon, S.; Cui, J.; Taylor, K.D.; Wilson, L.; Cummings, O.W.; Chen, Y.D.; Rotter, J.I. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. Gastroenterology, 2010, 139(5), 1567-76, 1576.e1-6.

18. Sreekumar, R.; Rosado, B.; Rasmussen, D.; Charlton, M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology, 2003, 38(1), 244-251.

19. Younossi, Z.M.; Baranova, A.; Ziegler, K.; Del Giacco, L.; Schlauch, K.; Born, T.L.; Elariny, H.; Gorreta, F.; VanMeter, A.; Younoszai, A.; Ong, J.P.; Goodman, Z.; Chandhoke, V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 2005, 42(3), 665-674.

20. Washington, K.; Wright, K.; Shyr, Y.; Hunter, E.B.; Olson, S.; Raiford, D.S. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. Hum. Pathol, 2000, 31(7):822-828.

21. Omary, M.B.; Ku, N.O.; Toivola, D.M. Keratins: guardians of the liver. Hepatology, 2002, 35, 251-257.

22. Chiappini, F.; Barrier, A.; Saffroy, R.; Domart, M.C.; Dagues, N.; Azoulay, D.; Sebagh, M.; Franc, B.; Chevalier, S.; Debuire, B.; Dudoit, S.; Lemoine, A. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. Lab. Invest., 2006, 86(2), 154-165.

23. Cheung, O. ; Puri, P. ; Eicken, C. ; Contos, M.J. ; Mirshahi, F. ; Maher, J.W. ; Kellum, J.M. ; Min, H. ; Luketic, V.A. ; Sanyal, A.J. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. Hepatology, 2008, 48(6), 1810-1820.

24. Filipowicz, W.; Grosshans, H. The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential. Prog. Drug. Res., 2011, 67, 221-238.

25. Douette, P.; Navet, R.; Gerkens, P. ; de Pauw, E. ; Leprince, P. ; Sluse-Goffart, C. ; Sluse, F.E. Steatosis-induced proteomic changes in liver mitochondria evidenced by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. J. Proteome Res., 2005, 4(6), 2024-2031.

26. Kirpich, I.A.; Gobejishvili, L.N.; Bon Homme, M. ; Waigel, S.; Cave, M.; Arteel, G.; Barve, SS.; McClain, C.J.; Deaciuc, I.V. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. J. Nutr. Biochem., 2011, 22(1), 38-45.

27. Sokolovic., M.; Sokolovic., A.; van Roomen, C.P.; Gruber, A.; Ottenhoff, R.; Scheij, S.; Hakvoort, T.B.; Lamers, W.H.; Groen, A.K. Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis--transcriptomic and lipid profiling. J. Hepatol., 2010, 52(5), 737-744.

28. De Gottardi, A. ; Vinciguerra, M. ; Sgroi, A. ; Moukil, M. ; Ravier-Dall'Antonia, F. ; Pazienza, V. ; Pugnale, P. ; Foti, M. ; Hadengue, A. Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. Lab. Invest., 2007, 87(8), 792-806.

29. Eccleston, H.B.; Andringa, K.K.; Betancourt, A.M.; King, A.L.; Mantena, S.K.; Swain, T.M.; Tinsley, H.N.; Nolte, R.N.; Nagy T.R.; Abrams, G.A., Bailey, S.M. Chronic exposure to a high fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. Antioxid. Redox. Signal, 2010, Oct 4. [Epub ahead of print].

30. Wang, H.; Chan, P.K.; Pan, S.Y.; Kwon, K.H.; Ye, Y.; Chu, J.H.; Fong, W.F.; Tsui, W.M.; Yu, Z.L. ERp57 is up-regulated in free fatty acids-induced steatotic L-02 cells and human nonalcoholic fatty livers. J. Cell. Biochem., 2010, 110(6), 1447-1456.

31. Zhang, X.; Yang, J.; Guo, Y.; Ye, H.; Yu, C.; Xu, C.; Xu, L.; Wu, S.; Sun, W.; Wei, H.; Gao, X.; Zhu, Y., Qian, X.; Jiang, Y.; Li, Y.; He, F. Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: enoyl-coenzyme a hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. Hepatology, 2010, 51(4), 1190-1199.

32. Younossi, Z.M.; Jarrar, M.; Nugent, C.; Randhawa, M.; Afendy, M.; Stepanova, M.; Rafiq, N.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; Baranova, A. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Obes. Surg., 2008, 18(11), 1430-1437.

33. Younossi, Z.M.; Baranova, A.; Stepanova, M.; Page, S.; Calvert, V.S.; Afendy, A.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; Liotta, L.; Petricoin, E. Phosphoproteomic biomarkers predicting histologic nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. J. Proteome Res., 2010, 9(6), 3218-3224.

34. Trak-Smayra, V.; Dargere, D.; Noun, R.; Albuquerque, M.; Yaghi, C.; Gannagé-Yared, M.H.; Bedossa, P.; Paradis, V. Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. Gut, 2009, 58(6), 825-832.

35. Ulukaya, E.; Yilmaz, Y.; Moshkovskii, S.; Karpova, M.; Pyatnitskiy, M.; Atug, O.; Dolar, E. Proteomic analysis of serum in patients with non-alcoholic steatohepatitis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Scand. J. Gastroenterol., 2009, 44(12), 1471-1476.

36. Bell, L.N.; Theodorakis, J.L.; Vuppalanchi, R.; Saxena, R.; Bemis, K.G.; Wang, M.: Chalasani, N. Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 2010, 51(1), 111-120.

37. Cusi, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. Clin. Liver. Dis., 2009, 13, 545-563.

38. Donnelly, K.L.; Smith, C.I.; Schwarzenberg, S.J.; Jessurun, J.; Boldt, M.D.; Parks, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Invest., 2005, 115(5), 1343-1351.

39. Cheung, O.; Kapoor, A.; Puri, P.; Sistrun, S.; Luketic, V.A.; Sargeant, C.C.; Contos, M.J.; Shiffman, M.L.; Stravitz, R.T.; Sterling, R.K.; Sanyal, A.J. The impact of fat distribution on the severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. Hepatology, 2007, 46(4), 1091-1100.

40. Malhi, H.; Gores, G.J. Molecular mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. Semin. Liver Dis., 2008, 28, 360-369.

41. Gentile, C.L.; Pagliassotti, M.J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. J. Nutr. Biochem., 2008, 19, 567-576.

42. Han, M.S.; Park, S.Y.; Shinzawa, K.; Kim, S.; Chung, K.W.; Lee, J.H.; Kwon, C.H.; Lee, K.W.; Lee, J.H.; Park, C.K.; Chung, W.J.; Hwang, J.S.; Yan, J.J.; Song, D.K.; Tsujimoto, Y.; Lee, MS. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. J. Lipid. Res., 2008, 49, 84-97.

43. Puri, P.; Baillie, R.A. ; Wiest, M.M. ; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M.J.; Sanyal, A.J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 2007, 46(4), 1081-1090.

44. Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L.A. ; Thielemann, L.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin. Sci. (Lond), 2004, 106(6), 635-643.

45. Feldstein, A.E.; Werneburg, N.W.; Canbay, A.; Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Rydzewski, R.; Burgart, L.J.; Gores, G.J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology, 2004, 40(1), 185-194.

46. Neuschwander-Tetri, B.A.; Caldwell, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology, 2003, 37(5), 1202-1219.

47. Yao, P.M. and Ira, T. Free Cholesterol Loading of Macrophages Is Associated with Widespread Mitochondrial Dysfunction and Activation of the Mitochondrial Apoptosis Pathway J. Biol. Chem. 2000, 275, 23807-23813.

48. Nair, S.P.; Arnold, C.; Diehl, A.M. Hepatic ATP reserve and efficiency of replenishing: comparison between obese and nonobese normal individuals. Am. J. Gastroenterol., 2003, 98(2), 466-470.

49. Sanyal, A.J.; Campbell-Sargent, C.; Mirshahi, F.; Rizzo, W.B.; Contos, M.J.; Sterling, R.K.; Luketic, V.A.; Shiffman, M.L.; Clore, J.N. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology, 2001, 120(5), 1183-1192.

50. Yao, P.M.; Tabas, I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. J. Biol. Chem., 2001, 276(45), 42468-42476.

51. Duncan, R.E.; El-Sohemy, A.; Archer, M.C. Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genistein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. Cancer Lett., 2005, 224(2), 221-228.

52. Puri, P.; Wiest, M.M.; Cheung, O.; Mirshahi, F.; Sargeant, C.; Min, H.K.; Contos, M.J.; Sterling, R.K.; Fuchs, M.; Zhou, H.; Watkins, S.M.; Sanyal, A.J. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology, 2009, 50(6), 1827-1838.

53. Bass, N.M.; Merriman, R.B. Fatty acid metabolism and lipotoxicity in the pathogenesis of NASH. In: Non-Alcoholic Steatohepatitis, Farrell GC, George J, Hall P, McCullough AJ, Eds.; Blackwell Publishing: Oxford, UK; 2005; pp 109-22.

54 Cong, W.N.; Tao, R.Y.; Tian, J.Y.; Liu, G.T.; Ye, F. The establishment of a novel non-alcoholic steatohepatitis model accompanied with obesity and insulin resistance in mice. Life Sci., 2008, 82:983-90.

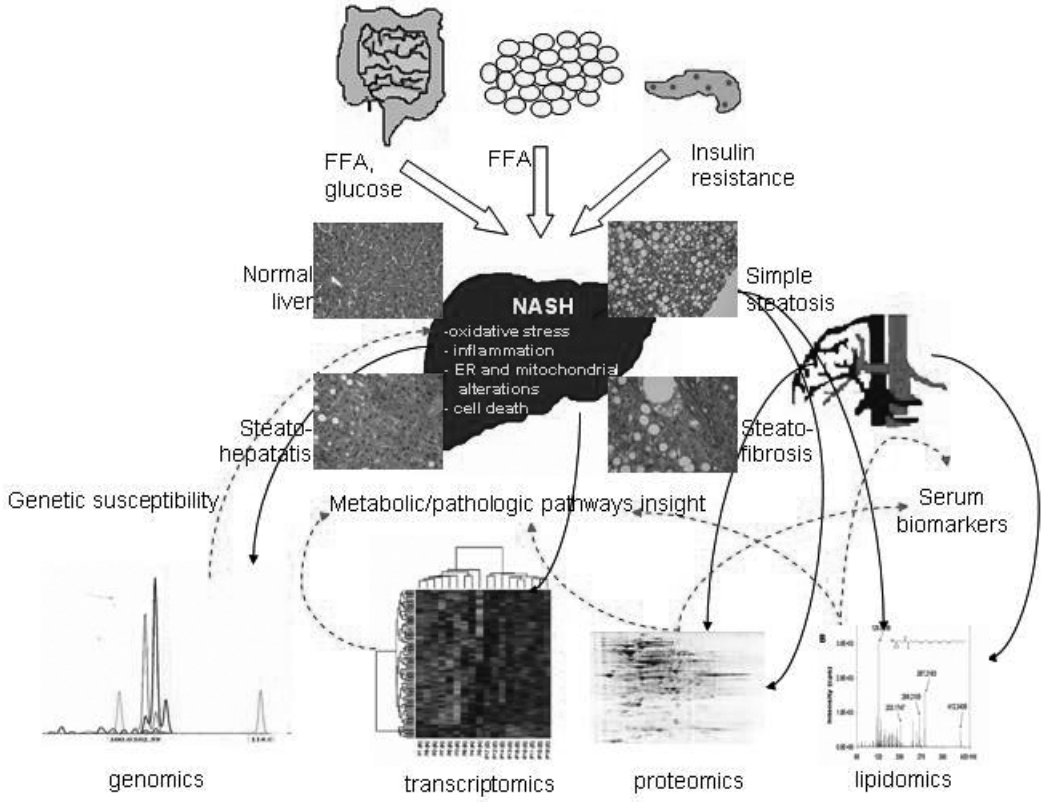
55 Kallwitz, E.R.; McLachlan, A.; Cotler, S.J. Role of peroxisome proliferatorsactivated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. World J. Gastroenterol., 2008, 14, 22-28.

56 Debois, D.; Bralet, M.P. ; Le Naour, F. ; Brunelle, A. ; Laprévote, O. In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. Anal. Chem., 2009, 81(8), 2823-2831.

57 Le Naour, F.; Bralet, M.P. ; Debois, D. ; Sandt, C. ; Guettier, C. ; Dumas, P. ; Brunelle, A. ; Laprévote, O. Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and ToF-SIMS microspectroscopies. PLoS. One, 2009, 4(10):e7408.

58 Tan, B.; Bradshaw, H.B.; Rimmerman, N.; Srinivasan, H.; Yu, Y.W.; Krey, J.F.; Monn, M.F.; Shih-Chieh Chen, J.; Shu-Jung Hu, S.; Pickens, S.R.; Walker, J.M. Targeted Lipidomics: Discovery of New Fatty Acyl Amides. AAPS Journal, 2006, 8(3), E461-E465.

Figure 1. **Scheme of the use of omics technologies for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) study.** Increasingly fatty and sugared diet, adipose tissue-derived free fatty acids and insulin resistance contribute to the onset of NAFLD, a syndrome presenting a wide spectrum of disorders, ranging from simple steatosis to steatohepatitis and cirrhosis at more advanced stage. The use of the different omics technologies on human samples at different stages of NAFLD (full lines) and the bioinformatic integration of their data improve the knowledge of the pathogenesis (dashed lines), providing molecular targets for developing therapies and biomarkers for early detection of patients with higher risk to progress towards non-alcoholic steatohepatitis and its clinical complications. Lipidomics mass spectra are adapted from Tan *et al*. (58).



II-2. Etude du rôle d'une sous-unité du récepteur NMDA dans la régulation de la mort cellulaire dans la stéatohépatite non alcoolique

Article 6: GRINA activation decreases hepatocytes apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in Non-Alcoholic Steatohepatitis

Degli Esposti D*, Domart MC*, Saffroy R, Hamelin J, Martel C, Bouchet A, Azoulay D, Brenner C, Lemoine A.

* Ces auteurs ont contribué également à ce travail

Soumis

Situation du sujet

La stéatohépatite est une maladie inflammatoire du foie, caractérisée par une accumulation intrahépatocytaire de lipides, une présence d'infiltrat mixte de neutrophiles et cellules mononuclées associée à une libération de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que par une mort cellulaire des hépatocytes par nécrose et apoptose.

Au cours d'une étude de profils génomiques des foies stéatosiques conduite au sein du laboratoire (Chiappini et al 2006), il a été observé une augmentation de l'expression d'un gène codant pour une sous-unité à 7 domaines transmembranaires d'un récepteur au glutamate, GRINA (glutamate receptor, ionotropic, NMDA-associated protein 1, glutamate binding). GRINA appartient par homologie de séquence et de structure à la famille des protéines *Bax-Inhibitors* (Zhou et al 2008). Bax est une protéine cytosolique qui, à la suite des stimuli apoptotiques, est transloquée à la mitochondrie, déclenchant la voie mitochondriale de l'apoptose. Il a été récemment montré que l'expression de certains membres de la famille des *Bax-Inhibitors*, notamment BI-1, est altérée au cours des hépatopathies chroniques (Kotsafti et al 2010, Bailly-Maitre et al 2010). La littérature sur ce récepteur est limitée à des études *in silico* ou génomiques et sa fonction dans le foie est complètement inconnue. C'est pourquoi nous avons choisi d'en approfondir l'étude.

Ce travail vise à étudier l'expression de GRINA dans le foie humain soumis à un stress chronique tel que la stéatose et à comprendre sa fonction dans le contexte de la mort cellulaire hépatocytaire.

Résultats et discussion

Nous avons confirmé l'expression de GRINA dans les foies stéatosiques par immunohistochimie et qRT-PCR et nous avons corrélé son expression au degré de stéatose. Ces résultats sont à

rapprocher des conséquences d'un excès de glutamate induisant une obésité, une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique dans des modèles murins (Nagata et al 2006, Nakanishi et al J 2008) et des stress chroniques, tels que le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique (RE), une altération des mitochondries et un micro-environnement pro-inflammatoire, présents dans la NASH.

Nous avons étudié les effets de ces différents types de stress afin d'identifier ceux qui étaient associés à une augmentation de l'expression de GRINA. Nous avons utilisé à cet effet deux modèles cellulaires, une lignée d'hépatome (PLC/PRF/5) et une lignée non cancéreuse d'hépatocytes immortalisés (HHL16). Nous avons également développé un modèle qui mime la stéatohépatite, en traitant ces deux lignées soit par l'insuline et l'hydrocortisone, soit par un milieu enrichi en acides gras libres comme l'oléate et le palmitate. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de la transcription de GRINA à la suite de traitements induisant une accumulation de lipides, un stress du RE, une libération de NO ou à la suite d'un traitement par un agoniste du glutamate, le NMDA.

Nous avons testé l'hypothèse que le glutamate pouvait induire lui-même un stress du RE. Nous avons en effet observé, lors du traitement avec le glutamate, une augmentation dose et temps-dépendante du facteur de transcription GADD153/CHOP, connu pour être induit au cours du stress du RE (Oyadomari & Mori 2004). Parallèlement, nous avons étudié le facteur de transcription NFκB, acteur central dans l'inflammation hépatique (Baker et al 2011) et pouvant être induit par un stress du RE. Nous avons observé une augmentation de l'expression de NFκB p65 à la suite d'un traitement par NMDA ou dans le cas d'accumulation de lipides. L'inhibition de NFκB, nous a permis d'observer une diminution de l'expression de GRINA et CHOP, malgré le traitement par NMDA.

Nous avons étudié la réponse au stress du RE induite par NMDA dans notre modèle de cellules stéatosiques. Nous avons observé une meilleure tolérance des cellules stéatosiques à la mort cellulaire par rapport aux cellules contrôle. NMDA induit en effet une diminution de la transcription et de l'expression de Bax totale, ainsi que celle de CHOP, plus marquée dans les cellules stéatosiques. Ces résultats suggèrent que l'activation de GRINA par NMDA diminue la transcription de Bax, en accord avec les fonctions attendues d'un membre de la famille Bax Inhibitor. Les résultats du *silencing* génétique de GRINA par des siRNA confirment un rôle inhibiteur de GRINA sur l'expression de CHOP and NFκB p65 (Figure 5D).

Nous avons alors recherché si les cellules stéatosiques modulaient différemment la sécrétion d'IL-1b à la suite d'un stress du RE par rapport aux cellules contrôles. Nous avons observé que les cellules stéatosiques répondent spécifiquement à un stress du RE avec une diminution de la

libération d'IL-1β, tandis qu'un stress oxydant augmente à l'inverse la sécrétion de la cytokine de façon plus importante dans les cellules stéatosiques que dans les cellules contrôle. Cette réponse s'accompagne d'une tolérance accrue à la chute de potentiel de membrane mitochondriale à la suite d'un traitement par TNFα. L'ensemble de ces résultats suggère une corrélation entre l'expression de GRINA et une diminution de la sensibilité de cellules hépatiques aux insultes inflammatoires.

Nous avons aussi évalué l'effet de la synthétase du NO inductible (iNOS), car nous avions observé une augmentation de l'expression de GRINA à la suite d'un traitement avec un donneur de NO. Par ailleurs, iNOS semble jouer un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire et le développement de la stéatohépatite (Spruss et al 2011, Pasarin et al 2011). De façon intéressante, nous avons montré que iNOS est plus précocement et plus fortement exprimée dans les cellules stéatosiques soumises à un traitement avec NMDA et que NO n'est essentiel que dans les cellules stéatosiques pour garantir l'expression de GRINA et la diminution de la transcription de Bax.

GRINA, qui est décrit pour être un récepteur au glutamate et une protéine Bax-Inhibitrice, pourrait être un senseur du stress du RE et être activé en présence d'un excès de glutamate. Son activation protègerait les hépatocytes de la mort apoptotique en diminuant la transcription de Bax. De plus, GRINA pourrait atténuer un stress chronique du RE et l'inflammation dans la NASH à travers un rétro-contrôle négatif visant à diminuer l'expression CHOP and NFKB.

Endoplasmic Reticulum Stress-induced GRINA Decreases Apoptosis and Inflammation by inhibition of Bax transcription in Steatohepatitis

Davide Degli Esposti[1,2,3*], Marie-Charlotte Domart[1,2*], Raphaël Saffroy[1,2], Jocelyne Hamelin[1,2,3], Cécile Martel[4], Antonin Bouchet[1,2], Daniel Azoulay[2,5], Catherine Brenner[4**], Antoinette Lemoine[1,2,3**]

[1] AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier; 94804 Villejuif Cedex, France

[2] INSERM U1004, Université Paris Sud 11, IFR89, PRES Universud-Paris, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, France

[3] Université Paris Sud 11, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[4] INSERM U769, Université Paris Sud 11, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

[5] AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Chirurgie hépatobiliaire, 14 Avenue Paul Vaillant Couturier; 94804 Villejuif Cedex, France

[*] These authors contributed equally.

** These authors contributed equally sharing senior leadership.

Short title: Cytoprotection by GRINA in NASH

Keywords: Steatohepatitis, NASH, inflammation, ER stress, homeostasis

Correspondence: Pr Antoinette Lemoine, Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Paul Brousse, 94800 Villejuif, France

Phone +33 1 45 59 36 93, Fax +33 1 45 59 36 25, Email: antoinette.lemoine@pbr.aphp.fr, antoinette.lemoine@u-psud.fr

Grant support: Davide Degli Esposti is a fellow of NRB-Vaincre le Cancer and GCIF, Ile de France; Marie-Charlotte Domart and Cecile Martel are fellows of Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

For Peer Review

Abstract

Non- alcoholic steato-hepatitis (NASH) is a chronic inflammatory liver disease characterized by the intracellular accumulation of lipids, the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines as well as apoptotic or necrotic liver cell death. Here, we investigated the role of a novel seven transmembrane domain receptor, GRINA (glutamate receptor ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1) in NASH. We show that the increased expression of GRINA correlates with the degree of steatosis in human liver biospies. In two hepatocellular models, lipid overload, insulin/corticoid treatment as well as endoplasmic reticulum (ER) stress, increased the transcription of GRINA, reduced cell death and the release of IL-1β. Moreover, GRINA overexpression attenuated glutamate ER stress-induced apoptosis via the decrease of NFκB p65, CHOP and Bax expression. Silencing studies and pharmacological experiments confirmed that the protective role of GRINA required NO and CHOP regulation. These results suggest that GRINA, a member of the Bax Inhibitor (BI) family, functions as a sensor controlling the cell fate in steatotic cells. On the one hand, its activation decreases apoptosis by regulating the transcription of Bax and on the other hand, its upregulation by NO protect the hepatocytes. Therefore, the overexpression of GRINA in chronic ER stressed pathologies such as steatohepatitis may be an early and important factor that may represent a therapeutic target to reduce inflammation and increase cell survival.

For Peer Review

INTRODUCTION

The molecular mechanisms leading to Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) in humans are not fully understood yet, although the prevalence of NAFLD in the general population has been estimated between 15 to 30% in developed countries (1;2). NAFLD is strongly associated with insulin resistance and excessive body weight, which are cardinal central cores of metabolic diseases. Circulating free fatty acids (FFA) originating from excessive adipose tissue lipolysis and *de novo* liver lipogenesis are known to contribute to the development of NAFLD (3). The inflammatory status of NAFLD, which characterizes Non Alcoholic SteatoHepatitis (NASH), can originate from an intricate network of genetic and environmental factors. The candidate mediators of liver injury potentially include alterations in circulating cytokines, adipokines, reactive oxygen or nitrogen species and FFA leading to chronic cell death (4;5). In hepatocytes, pro-apoptotic mediators activate the lysosomal pathway of cell death or signaling pathways leading to mitochondrial membrane permeabilization, cytochrome c release and caspase activation (4). The endoplasmic reticulum (ER) stress pathways, which are mediated by the Unfolded Protein Response (UPR), have been well characterized in pancreatic β cells of diabetic patients (6;7) and they have also been shown to be activated in NASH (8). However, fatty hepatocytes exhibit a depletion of NAD+ and ATP leading to necrosis rather than apoptosis (9;10). Necrotic liver cells release pro-inflammatory mediators, especially TNF-α and IL-1β, which can activate effector functions of immune cells, as well as hepatocyte intracellular signalling pathways controlling cellular homeostasis (11). The mechanism(s) responsible for cytokine-induced hepatocyte death, however, remain(s) in part to be clarified.

We have previously analyzed genomic profiles in human liver steatosis (12) and observed the increased expression of a gene coding for a glutamate receptor (GRINA; glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding)). This gene encodes a G protein-coupled receptor (GPCR) that has been poorly described and has never been studied in the liver. In order to identify the potential protein domains of GRINA, we used a bioinformatical approach based on the tools and databases available online. Sequence analysis showed that GRINA is an evolutionarily conserved protein containing seven transmembrane domains. Its localization was predicted to be the endoplasmic reticulum (ER) and the plasma membrane. At the C-terminus we identified a conserved domain characteristic of a new protein family, the Bax Inhibitor (BI)-1 like family, whose members function as anti-apoptotic proteins *via* Bax or Bcl-2 activity modulation. Indeed, GRINA, also

For Peer Review

called TMBIM-3 (transmembrane Bax inhibitor motif containing 3) shows at primary structure level 39% pairwise identity (58% similarity) with FAIM-2 (Fas apoptotic inhibitory molecule 2; TMBIM2), 35% (50% similarity) with TMBIM-1 and 34% (55% similarity) with TMBIM-4, three other members of this family.

The current work is devoted to the study of the expression and regulation of GRINA in human non alcoholic steatohepatitis (NASH), a chronic liver disease associating steatosis, inflammation and persistent cell death. We have shown that GRINA may be a sensor of endoplasmic stress to reduce cell death and inflammation in liver cells by the decrease of Bax transcription.

MATERIALS AND METHODS

Sequence analysis

The primary amino acid sequence of human GRINA was analyzed by several programs to predict the transmembrane regions and topology (TOPPRED2, TMPRED, TMHMM, HMMTOP and SMART) as well as the localization of GRINA (PSORT II, SignalP and TargetP). A Kyte and Doolittle hydropathic plot (13) was generated with ProtScale (http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl) with Kyte and Doolittle option. Pfam (http://pfam.wustl.edu/) and SMART domain analysis programs were used to predict the domain architecture of GRINA. We used ScanProsite (http:www.expasy.org/tools/scanprosite/PROSITE) and NCBI RPS-BLAST for conserved domain database screening.

Tissue and Cell Specimens

In our institution, liver biopsies are systematically performed in donors during liver graft harvesting to assess the degree of steatosis allowing to decipher the transplantation or the elimination of the liver graft. Steatosis has been graded by a pathologist, depending on the percentage of cells presenting lipid vacuoles in their cytoplasm, in grade 0 (<5%), grade 1 (5-30%) and grade 2 (30-60%). Fulminant hepatitis biopsies were obtained from recipients during total hepatectomy, before the emergency orthotopic transplantation of a liver graft. After histological examination, parts of the biopsies were frozen and stored at -80°C for later RNA extraction. A total of 27 liver biopsies with different grades of steatosis and 5 biopsies from fulminant hepatitis were studied.

For Peer Review

PLC/PRF/5 human hepatocellular carcinoma cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Immortalized non-cancerous primary hepatocytes (HHL16) are a generous gift from Dr A. Patel, MRC-University of Glasgow, Centre for Virus Research, Glasgow, UK (14) and cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; GIBCO Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 10% foetal bovine serum (ATGC Biotechnologie, Marnes la Vallée, France), 50µg/ml penicillin, 50µg/mL streptomycin et 100µg/mL neomycin (GIBCO), in 5% CO2 at 37°C.

Chemicals and Reagents

GRINA siRNA (Stealth RNAi) and negative control siRNA were purchased from Invitrogen. Cells were transfected using lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Polyclonal anti-GRINA antibody raised against the following peptide: CEVKGFVREN was produced in rabbit by Genosphere Biotechnologies (Paris, France). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Treatments

To induce lipidic vacuoles formation, the usual culture medium was supplemented either with 8µg/mL human recombinant insulin (GIBCO) and 0.1µM hydrocortisone (Sigma-Aldrich) or with 1mM oleate/palmitate (2:1 ratio) with 2% of BSA, as described in the literature (15). Cells were maintained in this medium for 48 hours and either recovered or further treated. Control or steatotic cells were treated with thapsigargin (TG; 1µM), 5µM A23187, tunicamycin (TN; 12.5µg/µL), H_2O_2 (100 µM), deferoxamine (DFX; 250µM), interleukin 1β (IL-1β, 100 U/ml), tumor necrosis factor-α (TNF-α; 1.33µg/L), etoposide (ETO, 5µM), arsenic trioxide (As_2O_3; 10µM), N-methyl-D-aspartate (NMDA; 500µM), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP; 250µM), Bay 11-7082 (20µM) for different times.

mRNA Extraction

mRNAs were extracted from 20 mg of tissue or 10^6 cells with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. A final elution volume of 75µL was used.

Real-time quantitative PCR

Reverse transcription and real-time quantitative PCR (QRT-PCR) were performed as described before (12). Specific primers for GRINA and Bax were chosen from the human

For Peer Review

genome database and the specificity of the nucleotide sequences chosen was confirmed by basic local alignment search tool (BLAST) searches. Primers were designed to bind to different exons, in order to minimize amplification of contaminating genomic DNA. In particular, for GRINA the forward primer sequence was 5'-GAACCTTGTT GCACTGCTGGT-3' and the reverse primer sequence was 5'-AGAGCAGAGCG CCCAGTGA-3'. A probe was designed in the same way for GRINA mRNA quantification (5'-CTCCATGCAGACCCGCTACGACTTCA-3'). For Bax, the forward primer sequence was 5'-CTGACATGTTTTCTGACGGCAA-3' and the reverse primer sequence was 5'-AATGTCCAGCCCATGATGGT-3'. TaqMan RNAse control reagents (Applied Biosystems), designed for ribosomal 18S RNA amplification or sfrs4 cDNA amplification (16), were used as a reference to normalize the results. For each sample, results were normalized, using the 18S RNA value or sfrs4 cDNA of the calibrator to obtain a final R-gene value.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 4 μm paraffin-embedded formalin-fixed tissue sections using the anti-GRINA antibody in 6 non-steatotic and 6 steatotic liver biopsies. Antigen retrieval was obtained by heat in a citrate buffer at pH 6. The revelation system was based on a three-step biotin-free immunophosphatase stain using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NTB) chromogene substrate (DAKO, Glostrup, Denmark) followed by nuclear red counterstaining.

Biochemical assays

Cell Titer Blue Assay (Promega) or Lactate dehydrogenase (LDH) activity were used to evaluate cell viability before caspase activity assessment. Cell Titer Blue Assay is based on the ability of viable cells to reduce resazurin into resorufin, which is highly fluorescent. Cells were incubated with the reagent for the last 45min of the treatment at 37°C and fluorecence was measured with the CytoFluor Multi-well Plate Reader. LDH activity in cell supernatants was measured by a spectrophotometric assay on a Beckman Synchron CX-7 automatic biochemistry analyzer (Beckman Coulter Inc.) using commercially available reagents supplied by Beckman.

IL-1β concentration in cell supernatants was measured using Quantikine Immunoassay (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), following the manufacturer's protocol.

Flow cytometric assay of mitochondrial membrane potential

For Peer Review

$DiOC_6(3)$ is used to detect variations in mitochondrial membrane potential (17). Treated cells were loaded with 40 nM of $DiOC_6(3)$ for 15 minutes at 37°C and fluorescence was measured by flow cytometry with FACSCAlibur flow cytometer and Cell Quest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Western Blot analysis

Whole protein extracts were prepared from each frozen samples as previously described (18). The membranes were probed with the following antibodies: rabbit polyclonal anti-GADD153/CHOP (R-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ; rabbit polyclonal anti-NFκB p65, clone C20 (Santa Cruz Biotechnology); polyclonal anti-GRINA antibody (Genosphere Biotechnologies) and mouse monoclonal anti-β-actin, clone AC-74 (Sigma-Aldrich). After overnight incubation with each primary antibody (except for anti-β-actin; 1h), the membranes were probed with horseradish peroxidase-conjugated IgG (DAKO) for 1 hour at room temperature. The proteins were then detected using an ECL Western Blotting detection system (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Images were captured with a Fuji Film Intelligent Dark Box II coupled to IRLAS-1000 pro V2.5 software (FujiFoto Film Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using R software version 1.8.0. Results are expressed as mean (m) ± standard deviation (SD). Means were compared pairwise in the different groups with the help of Student t-test.

RESULTS

GRINA expression in normal and fatty human livers

We have quantified GRINA mRNA levels in human liver biopsies. The expression of GRINA was increased in a linear fashion with the grade of steatosis to reach a significant ($p<0.05$) 60% increase in grade 2 steatotic livers compared to grade 0 (Figure 1A). Interestingly, no GRINA mRNA expression was found in fulminant hepatitis, which corresponds to the massive and acute destruction of hepatocytes preventing the establishment of tolerance mechanisms.

For Peer Review

Then we studied the expression of GRINA by immunohistochemistry. No GRINA staining was found in non-steatotic livers (Figure 1B), while we observed a cytoplasmic GRINA staining in hepatocytes of steatotic livers, mainly found in the centrilobular area (Figure 1C). Most but not all steatotic hepatocytes showed a positive immunostaining, while only some non steatotic hepatocytes showed a clear positive immunostaining.

GRINA gene transcription is activated by lipids accumulation or insulin/corticoids and ER stress.

Since NASH is characterized by lipid accumulation, ER stress, mitochondrial dysfunction and inflammation, we investigated whether some of these conditions might modulate GRINA transcription in PLC/PRF/5 and in HHL16 cells. Similar results were observed between the two cell lines in the different testing conditions (not shown). We observed that lipid accumulation associated with droplets formation induced an increase GRINA mRNA levels by 2 to 3-fold after 48 hours treatment after either high insulin/hydrocortisone or oleate/palmitate medium incubation (Figure 2A, B). By contrast, inflammatory cytokines (IL1β or TNF-α) or generic oxidative stress (e.g. H_2O_2) did not induce changes in GRINA mRNA transcription after 24 hours of treatment. We treated cells with molecules specifically inducing organelle stress for 24 hours and showed that mitochondrial dysfunction (deferoxamine, DFX or arsenic trioxide, As_2O_3) or genotoxic stress (etoposide, ETO) did not induce changes in GRINA mRNA transcription (Figure 2A, B). By contrast, three molecules known to induce ER stress, all increased GRINA transcription in both PLC/PRF/5 and in HHL16 cells. ER stress-promoting drugs exhibited a higher inducing effect on GRINA transcription in HHL16 cells compared with PLC/PRF/5 cells. Moreover, while the transcriptional effect of lipid accumulation was not different compared to ER stress-promoting drugs in PLC/PRF/5 cells, a statistically significant increase ($p<0.05$) in GRINA transcription was observed in HHL16 cells when treated with ER stress-promoting drugs compared to steatogenic conditions (Figure 2A, B). As the formation of nitric oxide (NO) is described in the development of hepatic steatosis, inflammatory response and ER stress (19-21), we tested the effects of SNAP, a NO donor, on GRINA expression and we observed a significant increase in GRINA mRNA transcription compared with the control. However, this increase was much lower compared with the effect of ER stress promoting drugs. Moreover, as GRINA is predicted to be a glutamate receptor, we tested the effects of NMDA, a glutamate agonist, and we observed, similarly to SNAP treatment, a significant increase in

For Peer Review

GRINA mRNA transcription compared with the control, but a much lower effect compared to ER stress-promoting drugs in both cell lines (Figure 2A, B).

Modulation of GRINA expression via NFκB during NMDA-induced ER stress.

Since we observed an increased expression of GRINA following NMDA, lipid and insulin/corticoid treatments, we tested the hypothesis that NMDA and lipid accumulation might be responsible for ER stress. We observed that NMDA induced a dose and a time dependent increase of GADD153/CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (GADD153/CHOP), a transcription factor induced during ER stress (22) (Figure 3A, 4A). We also observed an increased expression of CHOP in cells treated by thapsigargin (TG) or oleate/palmitate compared to control cells (Figure 3B).Insulin/hydrocortisone treatment also increased, although not significantly, CHOP expression. Concurrently, we observed that NMDA induced an increased expression of NFκB p65 (Figure 4A). Actually, NFκB may be activated during the UPR and in liver inflammation (23). In particular, NMDA induced a time dependent increase in NFκB p65 during the first 6 hours and a time dependent increase of IL1-β release in the medium up to 12 hours after NMDA treatment. When pre-treated for 3 hours with Bay 11-7082 (a NFκB inhibitor *via* the inhibition of IκB-α phosphorylation), before NMDA treatment, cells did not release IL1-β following NMDA treatment (Figure 4B). Interestingly, NFκB seems to sustain cell survival during the first 12 hours of NMDA treatment, while at 24 hours its inhibition decreased cell death as measured by LDH release (Figure 4C). Moreover, NFκB inhibition induced a dramatic decrease of GRINA and CHOP expression, all along NMDA stimulation (Figure 4A).

GRINA protects steatotic cells from cell death in NMDA-induced ER stress.

In order to investigate whether and how GRINA expression may modify the response of steatotic cells to ER stress, we treated control and steatotic cells with NMDA.

We first compared cell viability and observed that steatotic cells exhibited a significant decreased mortality following the treatment compared with control cells (Figure 5A). NMDA induced a time-dependent decrease in Bax transcription in both steatotic and control cells, but in steatotic cells mRNA Bax levels were always lower compared with control (Figure 5B). However, Bax protein levels tended to decrease only in steatotic cells ($p<0.06$ at 24 hours compared to t_0), compared to a time dependent increase in control cells ($p<0.05$ at 12 and 24 hours compared to t_0) (Figure 5C). CHOP expression showed a similar trend compared with

For Peer Review

Bax, as a time dependent increase was observed in control cells up to 12 hours ($p<0.05$ at 1; 6 and 12 hours compared to t_0), while a decrease was observed in steatotic cells after 24 hours of NMDA treatment ($p<0.05$). Interestingly, NFκB levels were lower in control cells compared with steatotic cells up to 6 hours. However, in steatotic cells we observed a time-dependent decrease in NFκB expression following NMDA treatment ($p<0.05$ at 12 and 24 hours compared to t_0), while an increased expression of NFκB was observed in control cells after 6 hours of NMDA treatement ($p<0.05$ at6; 12 and 24 hours compared to t_0). Concerning GRINA expression following NMDA treatment, a slight increase at early times ($p<0.05$ at 3 hours compared to t_0)followed by a decrease after 6 hours was observed in control cells, while higher levels of GRINA were observed in steatotic cells, in particular at t_0 and 24 hours time points comapred to controls (Figure 5C). Conversely, genetic silencing of GRINA by siRNA induced an increased expression of CHOP and NFκB p65 (Figure 5D).

We then investigated whether steatotic cells might modulate differently IL-1β secretion following ER stress induction compared to control cells. Interestingly we observed that NMDA and TG induced significantly higher secretion levels of IL-1β in control cells compared to steatotic cells and this effect was specific for ER stress inducing drugs, as oxidative stress induced by H_2O_2 and DFX induced a higher IL1 β secretion in steatotic cells than in control cells (Figure 6A). In order to test the hypothesis that steatotic cells respond differently to an inflammatory and pro-apoptotic stimulus, such as TNFα, we measured loss of mitochondrial membrane potential (mtΔψ) and we observed that following TNFα treatment, steatotic cells presented a decreased loss of mtΔψ compared to control cells, suggesting a correlation between GRINA expression and decreased sensitivity to inflammatory insult.

Finally, we investigated iNOS expression in control and steatotic cells during NMDA treatment and we observed a slight time-dependent increase in control cells, while an earlier and higher increase followed by stabilization was observed in steatotic cells (Figure 7A). In order to better understand the role of NO on GRINA expression, we treated control and steatotic cell with L-NAME, a specific inhibitor of iNOS. We observed that L-NAME did not modified substantially GRINA and Bax transcription levels in control cells, while a time dependent decrease in GRINA transcription and a concurrent increase in Bax transcription were observed in steatotic cells (Figure 7B, C).

For Peer Review

DISCUSSION

We have studied the expression of a new putative glutamate receptor, GRINA, mainly localized at ER membrane and reported to be also a Bax inhibitor protein (24) in human steatotic livers and in two cellular models of non-alcoholic steatohepatitis. Our results suggest that GRINA, which is induced by ER stress, may decrease cytokine-induced cell death.

First of all, we have shown that an increased expression of GRINA correlated with steatotic degree in human livers, while livers with fulminant hepatitis did not express GRINA. These results suggest that GRINA expression is induced in chronic stress conditions, but not in acute liver failure leading to a rapid cell death. Then we replicated these results in our cellular model, showing that lipid accumulation increased GRINA transcription.

Non-alcoholic steatohepatitis is characterized by lipid accumulation in hepatocytes and liver inflammation (25). ER stress has been recently described in the development of liver steatosis and inflammation (26;27). ER stress activates the unfolded protein response, an adaptive intracellular stress response to accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER. This signaling pathway can either result in the recovery of homeostasis, or can activate a cascade of events, which ultimately result in cell death (7). CHOP is one of the key proteins of ER stress-induced apoptosis (28). Moreover, ER stress is reported to induce NFκB, contributing to increase tissue inflammation in insulin resistance state (29). CHOP and JNK pathways have also been described in human NASH pathogenesis (28). In our model, we have shown that ER stress-inducing drugs, as well as NMDA, a glutamate agonist, induced GRINA transcription. Interestingly in an animal model of neonatal neuro-intoxication, glutamate also induces obesity, insulin resistance, diabetes and inflammation in adults (30-32), suggesting a pathogenic role of this amino acid in the development of steatohepatitis.

Further, we have shown that NMDA induced an increase in CHOP expression, suggesting that NMDA may cause an ER stress in epithelial cells. Moreover, we observed a time dependent increase in NFκB p65 expression. However, in steatotic cells overexpressing GRINA, NMDA induced a time dependent decrease in CHOP and NFκB expression and a decrease in Bax transcription, resulting in diminished cell death *via* a partial inhibition of apoptosis. Actually, we observed attenuation in IL-1β release in steatotic cells treated with ER stress-inducing agents, but the opposite was observed with oxidative stress-inducing agents. However, steatotic cells also showed a lesser decrease of mitochondrial potential membrane following TNFα treatment, despite that did not induce GRINA. Thus, it seems that GRINA expression is part of a pathway induced to decrease ER stress-induced and inflammatory cell

For Peer Review

death in steatotic cells. We hypothesize that this difference may be ascribed to an early activation of GRINA, which could attenuate ER stress and decrease apoptotic sensitivity by its Bax-Inhibitor function, as already described for Bax-Inhibitor 1 (BI-1) (33;34). These results suggest an anti-apoptotic function of this expected glutamate receptor. Interestingly, it has been recently shown that BI-1 mRNA levels are higher in early liver disease, while they decrease as liver damage progresses (35). The authors hypothesized that this increase might represent a protective effect with respect to tissue inflammation. Actually, GRINA may participate in this system that seems to be redundant probably to protect the vital functions of liver for the organism.

We observed that genetic silencing of GRINA increased NFκB and CHOP expression and that GRINA overexpressing steatotic cells showed a decreased expression of NFκB and CHOP and released less IL-1β during NMDA stimulation. These results seem to confirm an anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of GRINA. In fact, NFκB is a known mediator of inflammation even in the liver and its decreased expression by GRINA may decrease inflammatory lesions and tissue necrosis (23). CHOP-deficient mice tend to develop less fibrosis than wild type mice in a model of cholestatic-induced liver fibrosis (36), suggesting that CHOP inhibition by GRINA may limit cell death and ensure hepatocyte survival.

We have shown that NO exposure induced GRINA expression and that NMDA induced differently iNOS expression in steatotic cells compared to control cells. In particular the increase in iNOS expression was slow and time dependent in control cells, while it was rapidly followed by stabilization in steatotic cells. NO exposure has been associated with ER stress induced by Ca^{2+} depletion in pancreatic β cells (37;38) and ER stress has been shown to cause NO formation by iNOS induction in mouse embryonic fibroblast cell line (39), suggesting an important interplay between ER stress and NO signaling. However, it is considered that lower NO concentrations promote cell survival and proliferation, whereas higher levels favor cell cycle arrest, apoptosis, and senescence (40;41). Indeed, NO has been shown to have a protective effect during endoplasmic stress response in pancreatic ß cells (42). Similarly, our data showed that inhibition of NO production decreased GRINA transcription in steatotic cells with a concurrent increase of Bax transcription, suggesting a protective role of NO against ER stress by sustaining GRINA expression in a context of chronic ER stress.

In our models, GRINA may be an ER stress sensor activated in the presence of an excess of glutamate, and its activation may protect hepatocytes from apoptotic cell death by decreasing

For Peer Review

Bax transcription. Moreover, GRINA may attenuate chronic ER stress and inflammation in NASH by a negative feedback on UPR response, thus decreasing CHOP and NFκB expression.

For Peer Review

REFERENCES

1. McCullough A. The epidemiology and risk factors of NASH. In Farrel GC, George J, Hall P, McCullough A, eds. Fatty liver disease: NASH and related disorders. Malden, MA: Blackwell, 2005:23-37.
2. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology 2011;140:124-131.
3. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology 2010;51:679-689.
4. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiol Rev 2010;90:1165-1194.
5. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology 2010 52:774-788.
6. Volchuk A, Ron D. The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic β-cell. Diabetes Obes Metab 2010;12 Suppl 2:48-57.
7. Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of ER stress to liver diseases. Hepatology 2011;53:1752-1763.
8. Kammoun HL, Hainault I, Ferré P, Foufelle F. Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2009; 12:575-582.
9. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, Xaus C, et al.Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Hepatology 2001;34:1164-1173.
10. Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. Anat Rec (Hoboken) 2008;291684-291692.
11. Jeschke MG, Klein D, Thasler WE, Bolder U, Schlitt HJ, Jauch KW, Weiss TS. Insulin decreases inflammatory signal transcription factor expression in primary human liver cells after LPS challenge. Mol Med 2008;14:11-19.
12. Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, Sebagh M, et al. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. Lab Invest 2006;86:154-165.

For Peer Review

13. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982;157:105-132.
14. Clayton RF, Rinaldi A, Kandyba EE, Edward M, Willberg C, Klenerman P, Patel AH. Liver cell lines for the study of hepatocyte functions and immunological response. Liver International 2005;25:389–402.
15. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:830-840.
16. Waxman S, Wurmbach E. De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma. BMC Genomics 2007;8:243.
17. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. Cytometry 2000;42:74-78.
18. Barrier A, Olaya N, Chiappini F, Roser F, Scatton O, Artus C, Franc B, et al. Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion. FASEB J 2005;19:1617-1626.
19. Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC, Bergheim I. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. Antioxid Redox Signal 2011;14:2121-2135.
20. Gotoh T, Mori M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:1439-1446.
21. Pasarín M, Abraldes JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Mura VL, García-Pagán JC, Bosch J. Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD. J Hepatol. 2011 Feb 25. [Epub ahead of print].
22. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ 2004;11:381-389.
23. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metabolism 2011;13:11-22.
24. Zhou J, Zhu T, Hu C, Li H, Chen G, Xu G, Wang S, et al. Comparative genomics and function analysis on BI1 family. Comput Biol Chem. 2008;32:159-162.
25. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.World J Gastroenterol 2010;16:5286-5296.

For Peer Review

26. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science. 2004;306:457-461.
27. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell 2010;140:900-917.
28. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Gastroenterology. 2008;134:1641-1654.
29. Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factot-κB in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis receptor-associated factor 2. Biol Pharm Bull 2006;26:931-935.
30. Nagata M, Suzuki W, Iisuka S, Takeda S, Aburada M, Miyamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. Exp Anim 2006;55:109-115.
31. Alarcon-Aguilar FJ, Almanza-Perez J, Blancas G, Angeles S, Garcia-Macedo R, Roman R, Cruz M. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. Eur J Pharmacol 2008;599:152-158.
32. Roman-Ramos R, Almanza-Perez JC, Garcia-Macedo R, Blancas-Flores G, Fortis-Barrera A, Jasso EI, Garcia-Lorenzana M, et al. Monosodium Glutamate neonatal intoxication associated with obesity in adult stage is characterized by chronic inflammation and increased mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptors in mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011;108:406-413.
33. Xu Q, Reed JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. Mol Cell. 1998;1:337-346.
34. Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, Glavic A, et al. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. Mol Cell. 2009;33:679-691.
35. Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, Burra P, Bortolami M. Bax Inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver diseases. BMC Gastroenterology 2010;35:2-8.
36. Tamaki N, Hatano E, Taura K, Tada M, Kodama Y, Nitta T, Iwaisako K, et al. CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;294:G498-505.
37. Cardozo AK, Ortis F, Storling J, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen M, Van Eylen F, Mandrup-Poulsen T, Herchuelz A, Eizirik DL. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca2+ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum

For Peer Review

Ca2+, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. Diabetes 2005;54:452-461.

38. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:10845-10850.
39. Hsieh YH, Su IJ, Lei HY, Lai MD, Chang WW, Huang W. Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS. Biochem Biophys Res Commun 2007;359:643-648.
40. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. Free Radic Biol Med 2008;45:18-31.
41. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006;291:R491-511.
42. Kitiphongspattana K, Khan TA, Ishii-Schrade K, Roe MW, Philipson LH, Gaskins HR. Protective role for nitric oxide during the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 292: E1543-1554.

For Peer Review

Figure legends

Figure 1. GRINA expression in human livers. A) QRT-PCR analysis of GRINA mRNA expression in biopsies from patients with different grade of steatosis or with fulminant hepatitis. Results are expressed as GRINA/18S mRNA ratio. Nine biopsies were analyzed for each condition excepted for fulminant hepatitis (n=5 biopsies). * Statistically significant ($p<0.05$) compared to grade 0. ** Statistically significant ($p<0.001$) compared to grade 2. B-C) Representative results of immunohistochemical analysis of GRINA expression in human livers. No detectable expression was observed in non steatotic livers (B) while a cytosolic expression mainly in centrolobular hepatocytes was found in steatotic livers (C).

Figure 2. GRINA mRNA expression in response to different stresses. QRT-PCR analysis of GRINA expression (% GRINA compared to control non-treated cells (cnrtl)). A) PLC/PRF/5 cells were exposed to different drugs/treatments for 24 hours (see text for more details). * Statistically significant ($p<0.05$). B) Non-cancerous cell line HHL16 cells were exposed to the same drugs/treatments for 24 hours.

Figure 3. NMDA and steatogenic treatments-induced ER stress. PLC/PRF/5 cells were treated with various doses of NMDA (A), insulin/hydrocortisone (Insulin), oleate/palmitate (O/P) and thapsigargin (TG) (B) and total proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot for CHOP expression to assess endoplasmic reticulum (ER) stress. β-actin was used as control for loading and transfer. Optical density ratios were measured to quantify protein expression changes. Results are representitive of at least two independent experiments. Results statistically significant compared to control cells are indicated, * : $p<0.05$); ** : $p<0.01$.

Figure 4. GRINA expression and IL-1β release are mediated by NFκB. A) NFκB, GRINA and CHOP protein expression analyzed by Western blot following NMDA treatment with or without the NFκB inhibitor Bay 11-7082. β-actin was used as control for loading and transfer. Optical density ratios were calculated to quantify protein expression. Results are representitive of at least two independent experiments. B) IL-1β release in culture medium following NMDA treatment with or without the NFκB inhibitor Bay 11-7082. C) Lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture medium following NMDA treatment with or without

For Peer Review

the NFκB inhibitor Bay 11-7082. * Statistically significant ($p<0.05$) compared to control (t_0) cells. ** Statistically significant ($p<0.01$) compared to control (t_0) cells.

Figure 5. Steatotic cells are protected by cell death following NMDA-induced ER stress. A) Cell viability measured by a fluorimetric assay in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. B) Bax mRNA expression measured by qRT-PCR in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. C) NF-kB, CHOP, GRINA and Bax protein expression analyzed by Western blot in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. β-actin was used as control for loading and transfer. Optical density ratios were calculated to quantify protein expression. Results are representitive of at least two indipendent experiments. D) GRINA, CHOP and NFκB expression following genetic silencing of GRINA by siRNA. Control cells (cnrtl) were treated with a negative control siRNA.

Figure 6. Steatotic cells secreted less IL1β during ER stress and are protected by cytokine-induced cell death. A) IL1β release in culture medium following NMDA, thapsigargin (TG), H_2O_2 or deferoxamine treatments in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. B) Mitochondrial membrane potential measured by 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6)(3) following TGFα treatment in control and steatotic PLC/PRF/5 cells.

Figure 7. NO sustained GRINA expression in steatotic cells during ER stress. A) iNOS expression following NMDA treatment in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. β-actin was used as control for loading and transfer. Optical density ratios were calculated to quantify protein expression. Results are representative of at least two independent experiments. B) GRINA mRNA expression following NOS inhibitor L-NAME treatement in control and steatotic PLC/PRF/5 cells. C) Bax mRNA expression following NOS inhibitor L-NAME treatement in control and steatotic PLC/PRF/5 cells.

For Peer Review

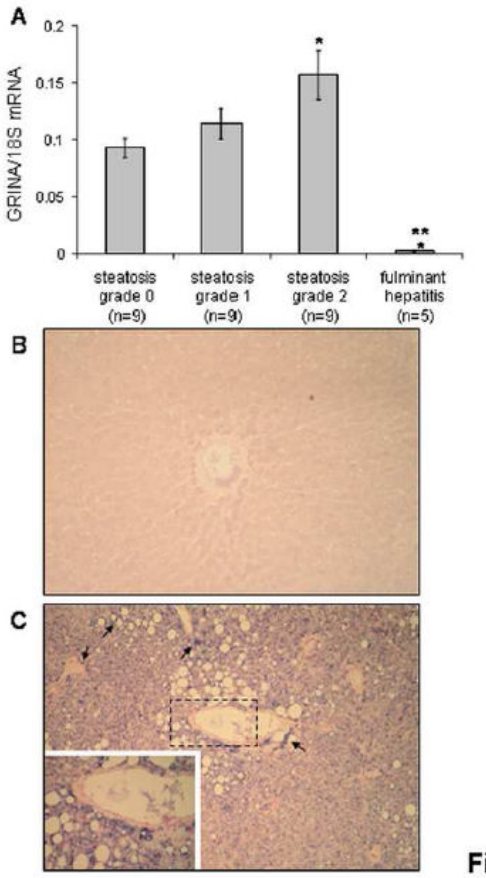


Figure 1

59x80mm (300 x 300 DPI)

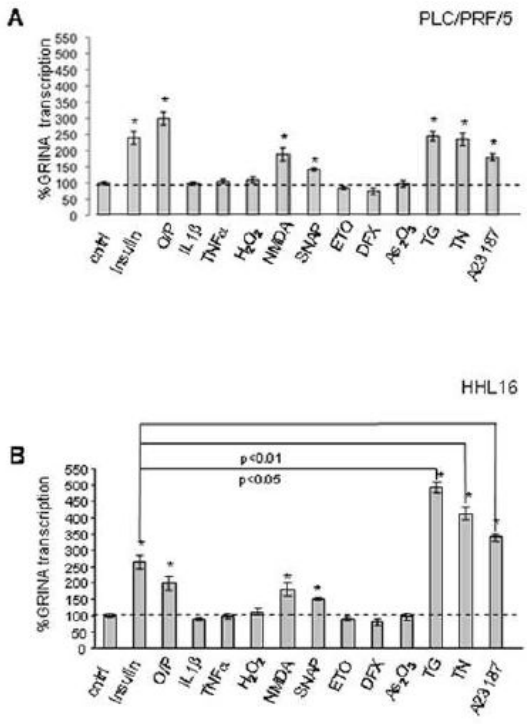


Figure 2

52x70mm (300 x 300 DPI)

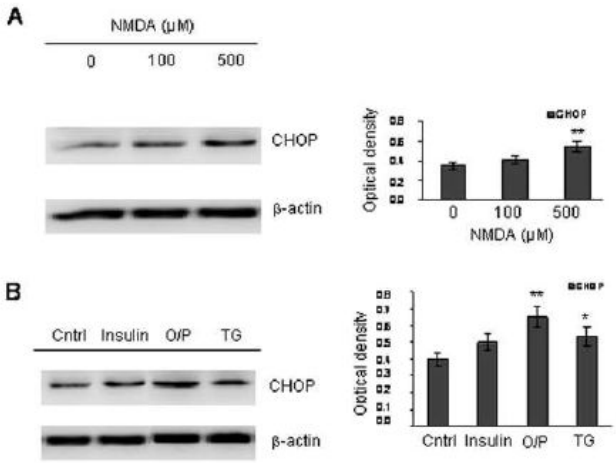


Figure 3

60x80mm (300 x 300 DPI)

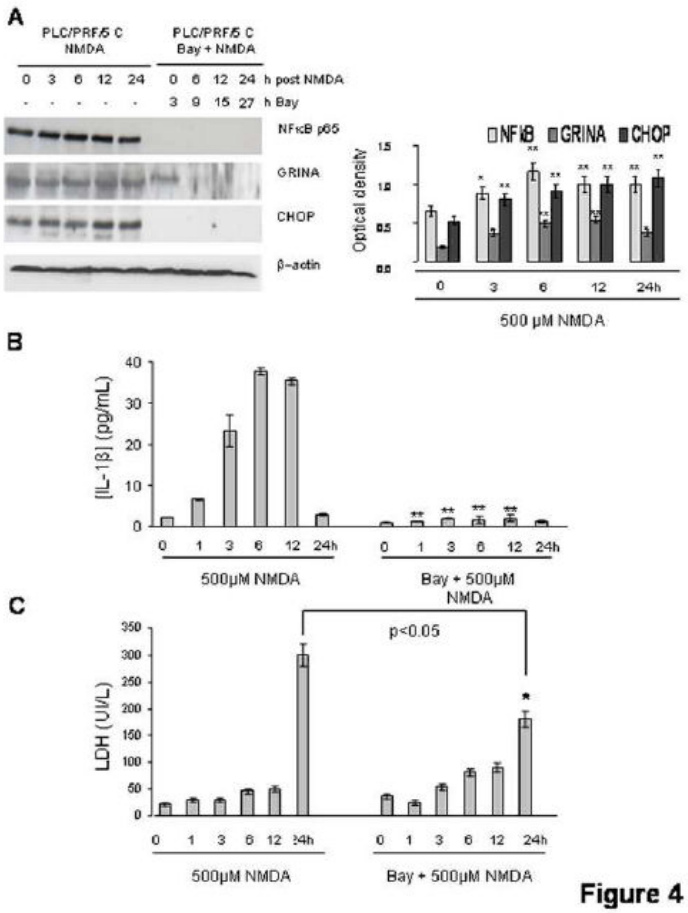


Figure 4

60x80mm (300 x 300 DPI)

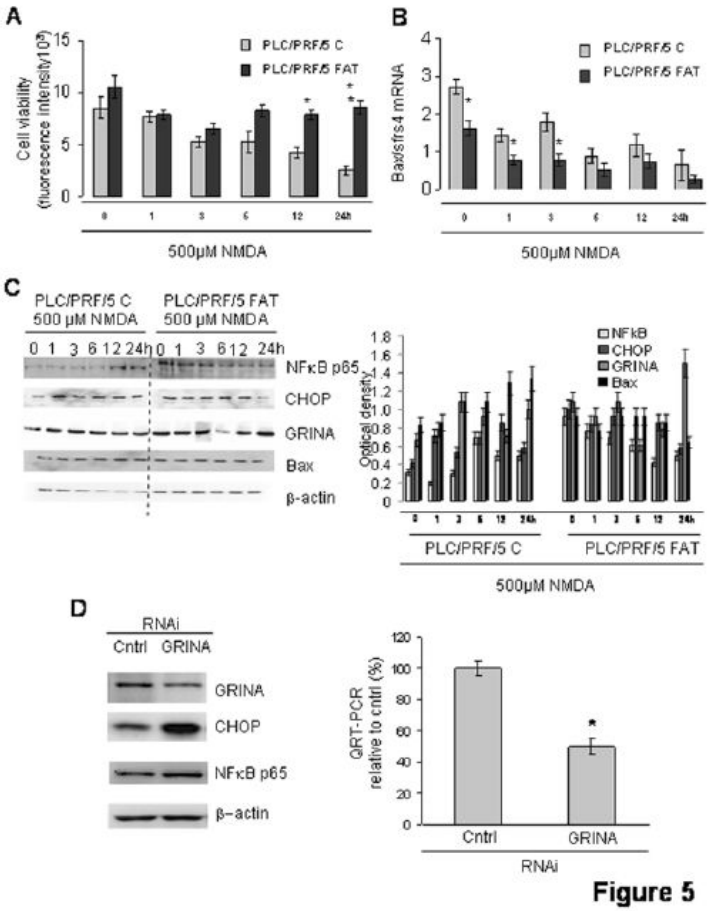


Figure 5

60x80mm (300 x 300 DPI)

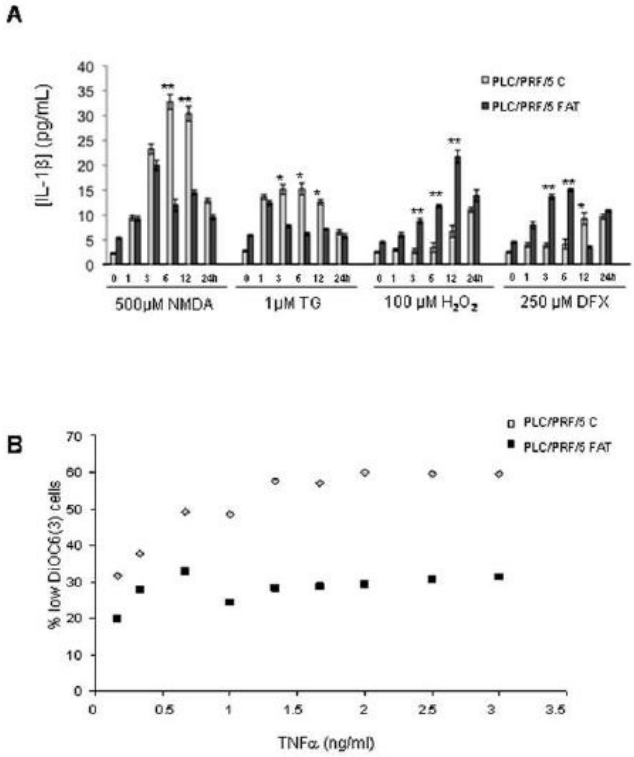


Figure 6

60x80mm (300 x 300 DPI)

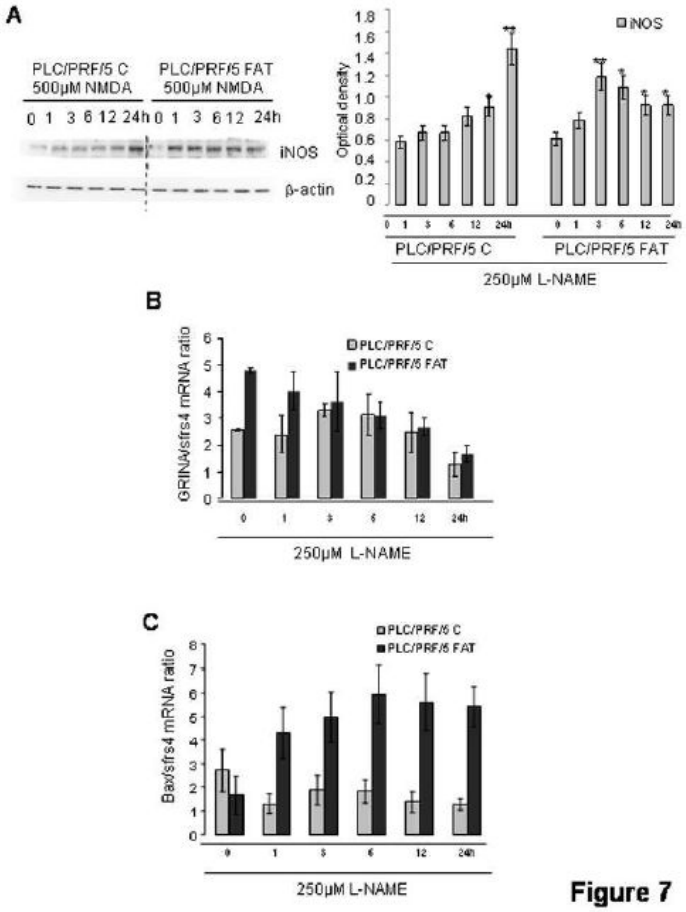


Figure 7

60x80mm (300 x 300 DPI)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours des dernières décennies il a été observé une augmentation des dimensions épidémiques de l'incidence de l'obésité et du diabète de type 2 chez l'adulte et l'enfant dans les pays industrialisés et en voie de développement (Flegal et al 2010, Hossain et al 2007). Les causes sont à rechercher dans les changements des conditions de vie, comme les repas à haute densité calorique, le manque d'activité physique, la prolongation de la durée de la vie, et plus récemment identifiée, l'exposition à des agents chimiques « obésogènes » (Flegal et al 2010, Hossain et al 2007, Grün & Blumberg 2009).

L'obésité et l'insulino-résistance sont associées à de nombreuses pathologies, parmi lesquelles, comme il a déjà été décrit dans les chapitres précédents, on retrouve la NAFLD, des maladies hépatobiliaires et différents types de cancers (Leclerq & Sempoux 2006, Fabbrini et al 2010, Hotamisligil 2006). La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la pathogenèse des ces maladies métaboliques est centrale tant pour leur prévention et diagnostic précoce, que pour l'amélioration des traitements et de la prise en charge des patients.

La stéatose hépatique est une condition pathologique généralement considérée comme bénigne, mais elle peut constituer la première étape de la progression d'une hépatopathie (alcoolique ou non alcoolique) vers des lésions plus sévères qui vont de la stéatohépatite jusqu'à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (Leclercq & Sempoux 2006, Page & Harrison 2009). Sa prévalence est en augmentation dans les pays occidentaux ainsi que dans les autres continents (Williams et al 2011, Charlton 2011). Les causes sont à rechercher dans les changements de style de vie ainsi que dans des facteurs environnementaux, tels que certains médicaments ou agents chimiques (Grün & Blumberg, 2009).

L'utilisation des greffons hépatiques présentant une stéatose hépatique, dans un contexte de pénurie de greffons, présente également une plus grande morbidité pour les receveurs de ces greffons. (Selzner & Clavien 2001, Peralta et al 2001).

Nous avons utilisé le cas particulier du préconditionnement ischémique, une technique chirurgicale qui consiste, grâce à de courtes périodes d'occlusion vasculaire avant l'ischémie, à conférer une protection du tissu contre les lésions d'I/R, pour étudier les mécanismes de survie mis en place par les hépatocytes stéatosiques au cours d'un stress d'ischémie/reperfusion (I/R). Dans deux contextes différents, celui d'une ischémie chaude au cours d'une hépatectomie partielle et celui d'une ischémie froide au cours de la transplantation hépatique, nous avons montré que l'autophagie peut jouer un rôle central dans la protection des hépatocytes stéatosiques.

L'autophagie est un processus catabolique d'autodéfense intracellulaire au cours duquel les organelles et les protéines sont incluses dans des vésicules ensuite adressées vers les lysosomes pour y être dégradées. Ce processus permet d'éviter une accumulation toxique des composants endommagés ou non nécessaires ainsi qu' un recyclage de ces composants pour soutenir l'homéostasie métabolique. Dans un tissu normal, l'association de lésions cellulaires et d'un stress temporaire, médié par l'autophagie, pourrait supprimer la cancérogenèse, tandis que dans un cancer avancé, l'autophagie permettrait une meilleure survie cellulaire au cours d'un stress grâce au recyclage de composés macromoléculaires (Mathew & White 2011). Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'autophagie pourrait ainsi permettre sa modulation pour atténuer les effets des lésions d'I/R au cours de la chirurgie hépatique, en particulier dans la transplantation hépatique et dans les hépatectomies majeures. Au-delà des indication dans la chirurgie, l'exploration de l'autophagie dans les pathologies chroniques du foie ouvrirait de nouvelles pistes thérapeutiques.

Cependant, il est envisageable qu'un dysfonctionnement de l'autophagie pourrait conduire à la genèse d'altérations cellulaires comme une instabilité génomique. Si celle-ci était avérée, elle pourrait correspondre à la présence d'une instabilité des microsatellites que notre équipe a dèjà décrite dans le carcinome hépatocellulaire et la cirrhose. Nous supposons qu'à l'origine de cette instabilité génomique coexistent différents types de mécanismes, parmi lesquels un dysfonctionnement de l'autophagie dans un foie stéatosique pourrait favoriser la survie de mitochondries endommagées, entrainant une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une production excessive de ROS peut être la cause d'une peroxydation lipidique et des protéines des organelles telles que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les lysosomes, voire les peroxysomes. Il est de plus en plus décrit un important *cross-talk* entre les différents organelles qui permettrait de maintenir l'homéostasie cellulaire (Ferri & Kroemer 2001; Le Bras et al 2006). L'équilibre entre la survie et la mort cellulaire dépend donc de l'intégration de cette signalisation complexe, qui concerne l'état énergétique de la cellule, la réponse aux stress transitoires et l'adaptation aux stress chroniques. Dans ce contexte, l'autophagie semble jouer un rôle central dans l'intégration de la réponse aux stress (Kroemer et al 2010), ce qui pourrait favoriser directement ou indirectement la transformation cancéreuse d'une cellule.

Nous approfondirons, dans des foies stéatosiques, le rôle de l'autophagie dans l'établissement d'une instabilité des microsatellites (MSI) de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondriae que nous avons déjà caractérisée. Des résultats préliminaires suggèrent qu'une diminution de l'autophagie soit liée en effet à une MSI mitochondriale. Elle s'accompagne d'une augmentation des marqueurs d'oxydation, notamment les concentrations en 8-oxo-deoxyguanidine et de peroxyde lipidique et

d'un nombre plus élevé de mitochondries. D'autres résultats préliminaires montrent une diminution de la transcription et de l'expression protéique de l'enzyme hMYH, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN mitochondrial par excision de bases. Nous approfondirons les liens entre le stress oxydant, l'activation de l'autophagie et la réparation de l'ADN mitochondrial dans des biopsies de foie stéatosique humain et dans des modèles cellulaires que nous avons développés.

Les hépatopathies non-alcoolique (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) sont caractérisées par une altération systémique du métabolisme et de la réponse inflammatoire. Une étude de transcriptomique sur des foies stéatosiques conduite au sein du laboratoire a en effet montré le rôle prépondérant dans la stéatose de gènes contrôlant l'homéostasie mitochondriale, l'inflammation et la mort cellulaire (Chiappini et al Lab Invest 2006). Parmi ces gènes d'intérêt, nous avons choisi d'approfondir l'étude d'un gène codant pour un récepteur au glutamate, acide aminé central dans le métabolisme hépatique et impliqué récemment dans la pathogenèse de la stéatose (Nagata et al 2006, Nakanishi et al 2008).

Nous avons ainsi montré pour la première fois l'expression hépatocytaire d'un récepteur au glutamate, GRINA, impliqué dans la protection contre la mort cellulaire des hépatocytes liée au stress du réticulum endoplasmique (RE) et à l'inflammation. Cette protéine appartient à la famille de « Bax Inhibitors » et nous avons, en effet, montré que GRINA protège les hépatocytes contre un excès de stress du RE en atténuant l'apoptose par une diminution de la transcription de Bax. Le RE et les voies de réponse aux protéines mal formées (Unfolded Protein Response, UPR) sont aussi impliqués dans la régulation de la lipogenèse (Hotamisligil 2010). De façon intéressante, la fonction adaptative et protectrice de l'UPR dans sa phase précoce semble importante pour diminuer la lipotoxicité d'un excès d'acides gras libres (Erbay et al 2009). Nous nous intéresserons au métabolisme de lipides au cours d'un stress du RE afin d'approfondir leur rôle dans la mort cellulaire voire dans la survie des hépatocytes dans la stéatose et la stéatohépatite.

Nous avons ainsi mis en évidence un rôle important de l'autophagie et du stress du RE dans le contrôle de la mort et de la survie cellulaires en réponse à des atteintes chroniques du foie par l'activation de diverses voies. Nous rechercherons comment l'autophagie ou la biogenèse des mitochondries ou des peroxisomes régulent le trafic intracellulaire des lipides.

Enfin, nous partirons des résultats obtenus avec nos modèles cellulaires de NASH pour approfondir la signalisation et le *cross talk* entre la voie NFKB et la voie de l'AMP-activated kinase (AMPK), une enzyme clé de l'homéostasie énergetique, dans la régulation de l'autophagie et de la réponse inflammatoire ainsi que leurs effets sur la survie cellulaire.

L'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance et la survie des hépatocytes chargés de lipides en réponse à un stress inflammatoire, ischémique ou du réticulum

endoplasmique semble donc essentielle. Elle permettrait en effet la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient améliorer la prise en charge des patients, augmenter le nombre de greffons disponibles pour les greffes, et la prévention des risques cancérogènes pour le foie.

BIBLIOGRAPHIE

Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, et al 1991. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. Transplant Proc 23:1538-1540.

Adami HO, Chow WH, Nyrén O, Berne C, Linet MS, Ekbom A, et al 1996. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. J Natl Cancer Inst 88:1472-1477.

Adams JM, Cory S 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene 26:1324-1337.

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. 2005. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. Gastroenterology 129:113-121.

Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. Diabetologia 49:755-765.

Aggarwal BB 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 3:745-756.

Alkhouri N, Dixon LJ, Feldstein AE 2009. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 3:445-451.

Aloia T, Sebagh M, Plasse M, Karam V, Levi F, Giacchetti S, et al. 2006. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. J Clin Oncol 24:4983-4990.

Amaravadi RK, Thompson CB 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. Clin Cancer Res 13:7271-7279.

Anezaki Y, Ohshima S, Ishii H, Kinoshita N, Dohmen T, Kataoka E, et al 2009. Sex difference in the liver of hepatocyte-specific Pten-deficient mice: A model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol Res 39:609-618.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, et al 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature 372:186-190.

Arun J, Clements RH, Lazenby AJ, Leeth RR, Abrams GA 2006. The prevalence of nonalcoholic steatohepatitis is greater in morbidly obese men compared to women. Obes Surg 16:1351-1358.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol 182:685-701.

Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebagh M, Adam R et al 2005. Effects of 10

minutes of ischemic preconditioning on the cadaveric liver on the graft's preservation and function. Ann Surg 242:133-139.

Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, et al 2006. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. J Am Coll Surg202: 203-211.

Bansal S, Liu CP, Sepuri NB, Anandatheerthavarada HK, Selvaraj V, Hoek J, et al 2010. Mitochondria-targeted cytochrome P450 2E1 induces oxidative damage and augments alcohol-mediated oxidative stress. J Biol Chem 285:24609-24619.

Bailey D, O'Hare P 2007. Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response. Antioxid Redox Signal 9:2305-2321.

Bailly-Maitre B, Belgardt BF, Jordan SD, Coornaert B, von Freyend MJ, Kleinridders A, et al 2010.Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. J Biol Chem 285:6198-6207.

Baker RG, Hayden MS, Ghosh S 2011. NF-kB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metabolism.13:11-22.

Barrier A, Olaya N, Chiappini F, Roser F, Scatton O, Artus C et al 2005. Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion. FASEB J.19:1617-1626.

Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B 2006. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion 6:1-28.

Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM 1998. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. J Gastrointest Surg 2: 292–298.

Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS 2007. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. Mol Cell Biol 27:5737-5745.

Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. 2000. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. Ann Intern Med 132:112-117.

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J, et al 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. Mol Cell Biol 29:2570-2581.

Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al 2008. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. Diabetes 57:2438-2444.

Bolli R 2000. The late phase of preconditioning. Circ Res 87:972-983.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, et al 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol 25:1025-1040.

Brea A, Mosquera D, Martín E, Arizti A, Cordero JL, Ros E 2005. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1045-1050.

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. Oncogene 22:8608-8618.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 40:1387-1395.

Brunt EM, Tiniakos DG 2010. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.World J Gastroenterol 16: 5286-5296.

Bugianesi E 2007. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. Clin Liver Dis 11:191-207

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S et al 2005a. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. Diabetologia 48:634-642.

Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G 2005b. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. Hepatology 42:987-1000.

Burt AD, Mutton A, Day CP 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. Semin Diagn Pathol 15:246-258.

Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C 2009. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. J Hepatol 50:789-796.

Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ 1999. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. Hepatology 29:664-669.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N Engl J Med 348:1625-1638.

Canbay A, Bechmann L, Gerken G 2007. Lipid metabolism in the liver. Z Gastroenterol 45(1):35-41.

Canelo R, Braun F, Sattler B, Klinge B, Lorf T, Ramadori G et al. 1999 Is a fatty liver dangerous for transplantation? Transplant Proc 31: 414–415.

Cano A, Ciaffoni F, Safwat GM, Aspichueta P, Ochoa B, Bravo E, et al. 2009. Hepatic VLDL

assembly is disturbed in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease: is there a role for dietary coenzyme Q? J Appl Physiol 107:707-717.

Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E 2000. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. Hepatology 31:166-172.

Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, Franco-Gou R, Xaus C, Casillas A 2005. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. J Hepatol 43:997-1006.

Chai W, Liu Z 2007. p38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor-kappaB degradation in human coronary artery endothelial cells. Endocrinology 148:1622-1628.

Chalasani N 2008. It remains unclear whether simple steatosis is truly benign. AGA Perspectives. February/March 2008.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 95:11715-11720.

Charlton MR 2011.Fibrosing NASH: on being a blind man in a dark room looking for a black cat (that isn't there). Gastroenterology 140:25-28.

Chen CL, Yang HI, Yang WS, Liu CJ, Chen PJ, You SL, et al 2008. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. Gastroenterology 135:111-121.

Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, et al. 2006. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. Lab Invest 86:154-165.

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell 137:1112-1123.

Choi SS, Diehl AM 2008. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. Curr Opin Lipidol 19:295-300.

Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z,Rousson V, et al. 2003. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg 238: 843-850.

Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC 2000. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. Ann Surg 232:155-162.

Codogno P, Meijer AJ 2010. Autophagy: a potential link between obesity and insulin resistance. Cell Metab 11:449-451.

Cohen MV, Baines CP, Downey JM 2000. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. Annu Rev Physiol 62:79-109.

Conus S, Simon HU 2008. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. Biochem Pharmacol 76:1374-1382.

Corcelle EA, Puustinen P, Jäättelä M 2009. Apoptosis and autophagy: Targeting autophagy signalling in cancer cells -'trick or treats'? FEBS J 276:6084-6096.

Czaja MJ 2010. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. Am J Physiol Cell Physiol 298:C973-978.

Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI 2003. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. J Clin Invest 111:1057-1064.

Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sørensen TI, et al. 2004. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. Gut 53:750-755.

Day CP, James OF 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998 114:842-845.

Dayton C, Yamaguchi T, Warren A, Korthuis RJ 2002. Ischemic preconditioning prevents postischemic arteriolar, capillary, and postcapillary venular dysfunction: signaling pathways mediating the adaptive metamorphosis to a protected phenotype in preconditioned endothelium. Microcirculation 9:73-89.

Degli Esposti D, Domart MC, Sebagh M, Harper F, Pierron G, Brenner C, et al 2010. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis.Autophagy 1:172-174

Degli Esposti D, Sebagh M, Pham P, Reffas M, Poüs C, Brenner C, et al 2011. Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes. Cell Death Dis 2:e111.

Dennis SC, Gevers W, Opie LH 1991. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? J Mol Cell Cardiol 1991 23:1077-1086.

Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, et al 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. J Cell Biol 191:155-168.

Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, et al 2008. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 68:9167-9175.

Diraison F, Moulin P, Beylot M 2003. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and

reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. Diabetes Metab 29:478-485.

Domart MC, Degli Esposti D, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G, et al 2009. Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. J Hepatol 51:881-889.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 115:1343-1351.

Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. Proc Natl Acad Sci U S A 106:14046-14051.

Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, et al 2008. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. Cell Metab 8:325-332.

El-Assal O, Hong F, Kim WH, Radaeva S, Gao B 2004. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. Cell Mol Immunol 1:205-211.

El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA 2007. Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. Hepatology 45:855-863.

El-Serag HB, Tran T, Everhart JE 2004. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 126:460-468.

Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. Nat Med 15:1383-1391.

Evan G, Littlewood T 1998. A matter of life and cell death. Science 281:1317-1322.

Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. Proc Natl Acad Sci USA 106:15430-15435.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic liver kinetics in obese men and women with non alcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 134:424-431.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology 51:679-689.

Farber JL, Chien KR, Mittnacht S Jr 1981. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible

cell injury in ischemia. Am J Pathol 102:271-281.

Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS 2008. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. Anat Rec (Hoboken). 291:684-692.

Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C 2004. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. Hepatology 40:820-826.

Feldstein AE 2010. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 30:391-401.

Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al 2003. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 125:437-443.

Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ 2003. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. J Hepatol 39:978-983.

Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology 40:185-194.

Fernández L, Carrasco-Chaumel E, Serafín A, Xaus C, Grande L, Rimola A et al 2004. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? Am J Transplant 4:888-899.

Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A et al 2002. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. Hepatology 36:562-572.

Ferré P, Foufelle F 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. Diabetes Obes Metab 12 Suppl 2:83-92.

Ferri KF, Kroemer G 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat Cell Biol 3:E255-63.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR 2010. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. JAMA 303:235-241.

Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A,Romagnoli R Cerutti E et al 2009. Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). Am J Transplant 9:1629-1639.

Franco-Gou R, Roselló-Catafau J, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Rimola A, Calvo N, et al 2006. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts. J Pathol 208:62-73.

Frongillo F, Avolio AW, Nure E, Mulè A, Pepe G, Magalini SC, et al 2009. Quantification of degree of steatosis in extended criteria donor grafts with standardized histologic techniques: implications for graft survival. Transplant Proc 41:1268-1272.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P 2006.Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta. 1757:1371-1387.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ 2009 16:1093-1107.

Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, et al 2010. Mitochondrial gateways to cancer. Mol Aspects Med 31:1-20.

Gan B, Guan JL 2008. FIP200, a key signaling node to coordinately regulate various cellular processes. Cell Signal 20:787-794.

Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Springer W%22%5BAuthor%5D et al 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat Cell Biol 12:119-131.

Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD 2003. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. J Hepatol 38:59-66.

Grace PA 1994. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 81:637-647.

Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al 2008. Gene expression in human NAFLD. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294: G1281-1287.

Green DR, Kroemer G 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. Nature 458:1127-1130.

Gregor MF, Hotamisligil GS 2007. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. J Lipid Res 48:1905-1914.

Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al 2009. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss.Diabetes 58:693-700.

Golstein P, Kroemer G 2007.Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci 32:37-43.

Ground KE 1982. Liver pathology in aircrew. Aviat Space Environ Med 53:14-18.

Grün F, Blumberg B. 2009. Endocrine disrupters as obesogens. Mol Cell Endocrinol 304:19-29.

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ 2004. Lysosomes in cell death. Oncogene 23:2881-2890.

Gusarova GA, Dada LA, Kelly AM, Brodie C, Witters LA, Chandel NS, Sznajder JI 2009. Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct

phosphorylation of protein kinase C zeta. Mol Cell Biol 29:3455-3464.

Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, et al 1997. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. Transplant Proc. 29:79-81.

Hamanaka RB, Chandel NS 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends Biochem Sci 35:505-513.

Hanahan D, Weinberg RA 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-674.

Harada M. Autophagy is involved in the elimination of intracellular inclusions, Mallory-Denk bodies, in hepatocytes. Med Mol Morphol 43:13-18.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell 6:1099-1108.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, et al 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell 11:619-633.

Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM 2002. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? Cardiovasc Res 55:534-543.

Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, et al 1999. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. J Biol Chem 1999 274:19228-19236.

Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, et al 2009. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.J Gastroenterol 44 Suppl 19:89-95.

Hashizume H, Sato K, Takagi H, Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, et al 2007. Primary liver cancers with nonalcoholic steatohepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 19: 827-834.

He C, Levine B 2010. The Beclin 1 interactome. Curr Opin Cell Biol 22:140-149.

He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, et al 2009. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. Cell 137:635-646.

Hetz C, Glimcher LH 2009. Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. Mol Cell 35:551-561.

Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB 1977. Liver histology in a 'normal' population--examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. Scand J Gastroenterol 12:593-597.

Hochachka PW 1986. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 231:234-241.

Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al 2000.Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. Nat Immunol 1:489-495.

Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL 1999. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. J Clin Invest 103:1067-1076.

Hossain P, Kawar B, El Nahas M 2007. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. N Engl J Med 356:213-215.

Hotamisligil GS 2006.Inflammation and metabolic disorders. Nature 444:860-867.

Hotamisligil GS 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell 140:900-917.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259:87-91.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE 2009. Cell death. N Engl J Med 361:1570-1583.

Hummasti S, Hotamisligil GS 2010. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. Circ Res 107:579-591.

Jagtap P, Szabó C 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. Nat Rev Drug Discov 4:421-440.

Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND, Rela M. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. Transplantation 2006; 81:169-174.

Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, Crago MS, Reimer KA 2001. Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. J Mol Cell Cardiol 33:1571-1588.

Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG 2006. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. Hepatology 43:474-484.

Junttila MR, Evan GI 2009. p53--a Jack of all trades but master of none. Nat Rev Cancer 9:821-829.

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, et al 2000. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A 97:8536-8541.

Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M 2005. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases.

Cell 120:649-661.

Kammoun HL, Hainault I, Ferré P, Foufelle F 2009. Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 12:575-82.

Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, et al 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. Mol Cell Endocrinol 195:109-118.

Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, et al 2011. Chaperone-mediated autophagy at a glance. J Cell Sci 124:495-499.

Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ 2002. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. Trends Biochem Sci 27:235-241.

Kim HC, Kim DJ, Huh KB 2009. Association between nonalcoholic fatty liver disease and carotid intima-media thickness according to the presence of metabolic syndrome. Atherosclerosis 204:521-525.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol 13:132-141.

Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 98:7522-7527.

Kim I, Xu W, Reed JC 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 7:1013-1030.

Kim JS, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, Dunn WA Jr, et al 2008. Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. Hepatology 47:1725-1736.

Kim SM, Han S 2003. Tyrosinase scavenges tyrosyl radical. Biochem Biophys Res Commun 312:642-649.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy 4:151-175.

Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. Traffic 7:129-145.

Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. Nat Cell Biol 12:213-223.

Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B et al 2007. The ischemic

preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. Am J Transplant 7:2788-2796.

Kong JY, Rabkin SW 2000. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. Biochim Biophys Acta 1485:45-55.

Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S 2008. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. Gastroenterology 134:1369-1375.

Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Bergholm R, Frayn KN, Fielding BA, et al 2009. Liver fat and lipid oxidation in humans. Liver Int 29:1439-1446.

Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, Burra P, Bortolami M. Bax Inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver diseases 2010. BMC Gastroenterology 35:2-8.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, et al 2007.ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ 14:230-239.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 87:99-163.

Kroemer G, Jäättelä M 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. Nat Rev Cancer 5:886-897.

Kroemer G, Mariño G, Levine B 2010. Autophagy and the integrated stress response. Mol Cell. 40:280-293.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR et al 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. Mol Cell 17:525-535.

Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al 1993. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. Circ Res 72:1293-1299.

Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, et al 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:16419-16424.

Lagiou P, Kuper H, Stuver SO, Tzonou A, Trichopoulos D, Adami HO 2000. Role of diabetes mellitus in the etiology of hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 92:1096-1099.

Leber B, Lin J, Andrews DW 2007. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. Apoptosis 12:897-911.

Le Bras M, Rouy I, Brenner C 2006. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. Med Chem 2:1-12.

Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A 2007. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. J Hepatol 47:142-156.

Leclercq I, Sempoux C 2006. Hépatopatie non alcoolique: de la stéatose à la cirrhose. Acta Endoscopica 36:299-314.

Lee AH, Glimcher LH 2009. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. Cell Mol Life Sci 66:2835-2850.

Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, et al 2010. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. EMBO J 29:969-980.

Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS et al 2001. Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. Hum Pathol 32:250-256.

Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH 1994. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. Proc Natl Acad Sci USA 91:10878-10882.

Lefer AM, Lefer DJ 1996. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. Cardiovasc Res 32:743-751.

Lefkowitch JH 2005. Morphology of alcoholic liver disease. Clin Liver Dis 9:37-53.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med 185:1481-1486.

Le Naour F, Bralet MP, Debois D, Sandt C, Guettier C, Dumas P, et al 2009. Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and ToF-SIMS microspectroscopies. PLoS ONE 4:e7408.

Levine B, Klionsky DJ 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell 6:463-477.

Levine B, Kroemer G 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132:27-42.

Levy JR, Clore JN, Stevens W 2004. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. Hepatology 39:608-616.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr Rev 23:201-229.

Lewis JR, Mohanty SR 2010 Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. Dig Dis Sci 55:560-578.

Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE 2008.The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. Hepatology 47:1495-1503.

Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, et al 2009. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. J Biol Chem 284:31484-31492.

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell 87:565-576.

Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC 2008. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. J Biol Chem 283:31153-1162.

Loomba R, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. 2009. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 50:1282-1293.

Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, et al 2002.Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell 13:978-988.

Lowe SW, Cepero E, Evan G 2004. Intrinsic tumour suppression. Nature 432:307-315.

Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S et al 2008. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. J Clin Invest 118:3917-3922.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc. 55:434-438.

Lutz AK, Exner N, Fett ME, Schlehe JS, Kloos K, Lämmermann K et al 2009. Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. J Biol Chem 284:22938-22951.

MacSween RN, Burt AD 1986. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 6:221-232.

Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. EMBO J 26:2527-2539.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 8:741-752.

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Mol Cell 40:294-309.

Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ 2006. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. J Biol Chem 281:12093-101.

Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ 2007. Free fatty acids sensitise hepatocytes

to TRAIL mediated cytotoxicity. Gut 56:1124-1131.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology 43:S31-44.

Malhi H, Gores GJ 2008. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 28:360-369.

Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ 2010. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiol Rev 90:1165-1194.

Manekeller S, Seinsche A, Sioutis M, Hirner A 2009. Extended liver resection after preoperative chemotherapy: influence on regeneration and endoplasmic reticulum stress response. Langenbecks Arch Surg 394:681-688.

Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. 1999. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. J Clin Endocrinol Metab 84:1513-1517.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. 2003. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology 37:917-923.

Marí M, Fernández-Checa JC 2007. Sphingolipid signalling and liver diseases. Liver Int 27:440-450.

Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. Cell Metab 4:185-98.

Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS 2002. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. Hepatology 36:1349-1354.

Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H 1981. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 36:219-234.

Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrissa-Altés S, Casillas-Ramirez A, Rodés J, Roselló-Catafau J et al 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. Hepatology 47:461-472.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E 2007. Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer 7:961-967.

Mathew R, White E 2011. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. Curr Opin Genet Dev 21:113-119.

Mazure NM, Pouysségur J 2010.Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? Curr Opin Cell Biol 22:177-180.

McCord JM, Roy RS, Schaffer SW1985. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. Adv Myocardiol 5:183-189.

McCullough A 2004. The epidemiology and risk factors of NASH. In Fatty liver disease: NASH and related disorders. Farrel GC, George J, Hall P, McCullough A Eds. Blackwell Publishing, Oxford.

Meijer AJ, Codogno P 2007.Macroautophagy: protector in the diabetes drama? Autophagy 3:523-526.

Mendez-Sanchez N, Meda-Valdes P, Uribe M 2005. Alcoholic liver disease. An update. Ann Hepatol 4:32-42.

Meshkani R, Adeli K 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Clin Biochem 42:1331-1346.

Micheau O, Tschopp J 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114:181-190.

Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S 2009. Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. Obesity (Silver Spring) 17:1872-1877.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 451:1069-1075.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. Mol Biol Cell 15:1101-1111.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B 2010. Methods in mammalian autophagy research. Cell 140:313-326.

Møller H, Mellemgaard A, Lindvig K, Olsen JH 1994. Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. Eur J Cancer 30A: 344-350.

Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, et al 2009. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. Biochim Biophys Acta 1793:1524-1532.

Mortimore GE, Schworer CM 1977. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. Nature 270:174-176.

Mosbah BI, Alfany-Fernández I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, et al 2010. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. Cell Death Dis 1:e52.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell

injury in ischemic myocardium. Circulation 74:1124-1136.

Nagata M, Suzuki W, Iisuka S, Takeda S, Aburada M, Miyamoto K 2006. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. Exp Anim 55: 109-115.

Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, Salunga TL, Nomoto K, An JL, et al 2008. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. J Autoimmun 30:42-50.

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol 8:e1000298.

Navarro-Sabaté A, Peralta C, Calvo MN, Manzano A, Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, et al 2006. Mediators of rat ischemic hepatic preconditioning after cold preservation identified by microarray analysis. Liver Transpl 12:1615-1625.

Neuschwander-Tetri BA 2010. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology 52: 774-788.

Oh SW, Yoon YS, Shin SA 2005. Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. J Clin Oncol 23:4742-4754.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol 4:552-565.

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ; Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology 2010. Alcoholic liver disease. Hepatology 51:307-328.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. 2004 Apr;11(4):381-389.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science 306:457-461.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al 2009. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. Cell Metab 9:35-51.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. Science 313:1137-1140.

Page JM, Harrison SA 2009. NASH and HCC. Clin Liv Dis 13:631-647.

Pallet N, Fougeray S, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D 2009. Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. Transplantation 88:605-

613.

Parks DA, Granger DN 1986. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 250:749-753.

Pasarín M, Abraldes JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Mura VL, García-Pagán JC, Bosch J. Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD. J Hepatol. 2011 Feb 25. [Epub ahead of print].

Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S 2005. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. Eur J Vasc Endovasc Surg 29:106-115.

Patrick CH 1952. Alcohol, Culture, and Society. Durham, NC: Duke University Press.

Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P 2009. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. J Biol Chem 284:2719-2728.

Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpí E, Roselló-Catafau J 2001.Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Hepatology 34:1164-1173.

Peralta C, Brenner C. Endoplasmic réticulum stress inhibition enhances liver tolérance to ischemia/reperfusion. In press.

Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N, Roselló-Catafau J 1996. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. Biochem Biophys Res Commun 229:264-270.

Perlmutter DH 2009. Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in alpha-1-antitrypsin deficiency. Cell Death Differ 16:39-45.

Pessayre D, Fromenty B 2005. NASH: a mitochondrial disease. J Hepatol 42: 928-940.

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E 2004. Modulation of insulin action. Diabetologia 47:170-84.

Polesel J, Zucchetto A, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, La Vecchia C, et al 2009. The impact of obesity and diabetes mellitus on the risk of hepatocellular carcinoma. Ann Oncol 20:353-357.

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW 1990. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. Hepatology 11:74-80.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp Cell Res 283:1-16.

Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Juranic N, Macura S, Terzic A 2001.Cellular energetics in the

preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by 18O-assisted 31P NMR. J Biol Chem 276:44812-44819.

Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 46:1081-1090.

Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al 2008. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 134:568-576.

Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al 2009. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 50:1827-1838.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J Clin Invest 112:1809-1820.

Rautou PE, Cazals-Hatem D, Moreau R, Francoz C, Feldmann G, Lebrec D, et al 2008. Acute liver cell damage in patients with anorexia nervosa: a possible role of starvation-induced hepatocyte autophagy. Gastroenterology 135:840-848

Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R 2010. Autophagy in liver diseases. J Hepatol 53:1123-1134.

Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection. Crit Rev Immunol. 2008;28(3):229-48

Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nat Cell Biol 12:747-757.

Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG 2004. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. Diabetes 53:185-194.

Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, et al 2010. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. J Hepatol 52:727-736.

Rezkalla SH, Kloner RA 2002. No-reflow phenomenon. Circulation 105:656-662.

Rolo AP, Teodoro JS, Peralta C, Rosello-Catafau J, Palmeira CM 2009. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition. Transpl Int 22:1081-1090.

Ron D, Walter P 2007.Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 8:519-529.

Rosen ED, Spiegelman BM 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose

homeostasis. Nature 444:847-853.

Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkouls K, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. J Clin Invest 120:127-141.

Ruhl CE, Everhart JE. 2003. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States.Gastroenterology 124:71-79.

Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al 2011. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes.Dev Cell 20:405-406.

Sanges D, Marigo V 2006. Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. Apoptosis 11:1629-1641.

Santos RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI, Zhu X 2010. Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. Int J Clin Exp Pathol 3:570-581.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology 120:1183-1192.

Sato K, Cho Y, Tachibana S, Chiba T, Schneider WJ, Akiba Y 2005. Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. J Nutr 135:1636-1641.

Savolainen V, Perola M, Lalu K, Penttila A, Virtanen I, Karhunen PJ 1995. Early perivenular fibrogenesis–precirrhotic lesions among moderate alcohol consumers and chronic alcoholics. J Hepatol 23:524-531.

Schattenberg JM, Schuchmann M, Galle PR 2011. Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways. J Gastroenterol Hepatol 26:213-219.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z 2007.Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J 26:1749-1760.

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Mol Cell 2001 7:1165-1176.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. Diabet Med 22:674-682.

Schneider PD, Gorschboth CM 1983. Limiting ischemic liver injury by interfering with lysosomal autophagy. J Surg Res 34:550-554.

Scholz W, Albus U 1993. Na+/H+ exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol 88:443-455.

Schröder M, Kaufman RJ 2005. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 74:739-789.

Schuchmann M, Varfolomeev EE, Hermann F, Rueckert F, Strand D, Koehler H et al 2003. Dominant negative MORT1/FADD rescues mice from CD95 and TNF-induced liver failure. Hepatology 37:129-135.

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. Science 300:135-139.

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. J Hepatol 2002 37:56-62.

Selzner M, Clavien PA 2001. Fatty liver in liver transplantation and surgery. Semin Liver Dis 21:105-13.

Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA 2000. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. Hepatology 32:1280-1288.

Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, et al 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. J Clin Endocrinol Metab 87:3023-3028.

Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH 1998. Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A 95:9558-9561.

Shin T, Kuboki S, Huber N, Eismann T, Galloway E, Schuster R, et al 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during hepatic ischemia is age-dependent. J Surg Res 147:200-205.

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature 458:1131-1135.

Sinha S, Levine B 2008. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. Oncogene 27 Suppl 1:S137-148.

Sir D, Tian Y, Chen WL, Ann DK, Yen TS, Ou JH 2010. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A 107:4383-4388.

Slattery ML, Fitzpatrick FA 2009. Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology. Cancer Prev Res (Phila) 2:922-930.

Sonnenschein C, Soto AM 2008. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective.Semin Cancer Biol. 18:372-7.

Sørensen HT, Mellemkjaer L, Jepsen P, Thulstrup AM, Baron J, Olsen JH, Vilstrup H 2003. Risk of cancer in patients hospitalized with fatty liver: a Danish cohort study. J Clin Gastroenterol 36:356-359.

Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, Goodman KJ, Rubbia-Brandt L, et al 2003. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis.Med Sci Monit 9:CR6-11.

Springer W, Kahle PJ 2011. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. Autophagy 7(3).

Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC, Bergheim I. Role of the Inducible Nitric Oxide Synthase in the Onset of Fructose-Induced Steatosis in Mice. Antioxid Redox Signal. 2011 Mar 16. Epub ahead of print.

Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA 2010. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. Hepatology 51:1820-1832.

Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM 2008. A moderate increase in carnitine palmitoyltranferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. Am J Physiol Endocrinol Metab 294:E969-E977.

Summers SA 2006. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. Prog Lipid Res 45:42-72.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, et al 2001. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. Nature 414:313-317.

Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jinushi M et al 2004. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. Gastroenterology 127:1189-1197.

Tanti JF, Jager J 2009. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. Curr Opin Pharmacol 2009 9:753-62.

Teoh N, Dela Pena A, Farrell G 2002. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. Hepatology 36:94-102.

Teoh N, Field J, Farrell G 2006. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. J Hepatol 45:20-27.

Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP 1995. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. Hepatology 22:1714-1719.

Terman A, Gustafsson B, Brunk UT 2007. Autophagy, organelles and ageing. J Pathol 211:134-143.

Tiikkainen M, Häkkinen AM, Korsheninnikova E, Nyman T, Mäkimattila S, Yki-Järvinen H 2004. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. Diabetes 53:2169-2176.

Tilg H, Hotamisligil GS 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. Gastroenterology 131:934-945.

Tilg H, Moschen AR 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology 52:1836-1846.

Tiniakos DG 2009. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients. Gastroénterol Clin Biol 33:930-939.

Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ 2006. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. Am J Gastroenterol 101:2629-2640.

Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ 2009. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. Mediators Inflamm. 2009;2009:831670.

Uehara T 2007. Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders. Antioxid Redox Signal. 2007 May;9(5):597-601.

Unger RH 2002. Lipotoxic diseases. Annu Rev Med 53:319-36.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol 11:700-714.

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med 8:207-220.

VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL 2009. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. Am J Pathol 175:355-64.

Vick B, Weber A, Urbanik T, Maass T, Teufel A, Krammer PH et al 2009. Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. Hepatology 49:627-636.

Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J 2004. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med 37:1499-1507.

Vincent MF, Bontemps F, Van den Berghe G 1992. Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. Biochem J 281:267-272.

Vollmar B, Bauer C, Menger MD 2002. n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not

protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. Crit Care Med 30:1091-1098.

Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ 2006. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. Endocrinology 147:943-951.

Wang K, Klionsky DJ 2011. Mitochondria removal by autophagy. Autophagy 7(3) In press.

Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V et al 2001. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 280:2321-2328.

Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M 2009. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. Nature 460:534-537.

Wanless IR, Albrecht S, Bilbao J, Frei JV, Heathcote EJ, Roberts EA, et al 1989. Multiple focal nodular hyperplasia of the liver associated with vascular malformations of various organs and neoplasia of the brain: a new syndrome. Mod Pathol 2:456-462.

Wanless IR, Lentz JS 1990.Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. Hepatology12: 1106-1110.

Wanless IR, Shiota K 2004. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. Semin Liver Dis 24:99-106.

Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ 2006. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 291:E275-281.

Weickert MO, Pfeiffer AF 2006. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. Diabetologia 49:1732-1741

Weidemann A, Johnson RS 2008. Biology of HIF-1alpha. Cell Death Differ 15:621-627.

Weston SR, Leyden W, Murphy R, Bass NM, Bell BP, Manos MM, Terrault NA. 2005. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. Hepatology 41:372-379.

White E, DiPaola RS 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. Clin Cancer Res 15:5308-5316.

Wideroff L, Gridley G, Mellemkjaer L, Chow WH, Linet M, Keehn S, et al 1997. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. J Natl Cancer Inst 89:1360-1365.

Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE 2006. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty

liver disease. Hepatology 44:27-33.

Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al 2011. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology 140:124-31.

Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nat Immunol 10:348-355.

Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyrén O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, et al 2001. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). Cancer Causes Control 12:13-21.

Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S 2010. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. PLoS One;5:e9996.

Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, et al 2010. Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. Autophagy 6:61-66.

Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA 1999. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. Hepatology 30:1223-1231.

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med 13:332-339.

Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS 2010. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. Cell Metab 11:467-478.

Yang Z, Klionsky DJ 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. Curr Opin Cell Biol 22:124-131.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al 2000.ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell 6:1355-1364.

You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW 2005. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. Hepatology 42:568-577.

You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW 2010. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver.Gastroenterology 127:1798-1808.

Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, et al 2007. From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? Exp Cell Res 313:2033-2049.

Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J et al 2007. Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin

resistance. Proc Natl Acad Sci USA 104:17075-17080.

Zhou L, Liu F 2010. Autophagy: roles in obesity-induced ER stress and adiponectin downregulation in adipocytes. Autophagy 6:1196-1197.

Zhou J, Zhu T, Hu C, Li H, Chen G, Xu G, et al 2008. Comparative genomics and function analysis on BI1 family. Comput Biol Chem. 32:159-162.

Zechner R, Madeo F 2009. Cell biology: Another way to get rid of fat. Nature 458:1118-1119.

Zong WX, Thompson CB 2006. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev 20:1-15.

Zorzi D, Laurent A, Pawlik TM, Lauwers GY, Vauthey JN, Abdalla EK 2007. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. Br J Surg 94:274-286.

ANNEXES

Revue de la littérature sur les causes environnementales des cancers primitifs du foie et l'utilisation des études à long terme sur les rongeurs comme outils pour implémenter leur prévention primaire et diagnostic précoce.

Article 7: Environmental risk factors in primary liver cancer: a review of the literature and perspectives for primary prevention and early detection.

Degli Esposti D, Pham P, Saffroy R, Azoulay D, Debuire B, Lemoine A.
European Journal of Oncology 2009; 14: 133-150.

Cet article représente un lien entre l'activité de recherche que j'ai effectuée en Italie avant ma thèse dans le domaine des origines environnementales des cancers et celui que j'ai développé au sein du laboratoire sur la pathogenèse des cancers primitifs du foie. En effet, au sein du Centre de Recherche sur le Cancer « *Cesare Maltoni* », je coordonnais, sous la direction du Pr. Morando Soffritti, une étude de cancérogenèse fotale sur l'édulcorant artificiel aspartame et j'ai été responsable de deux études de pharmacogénomique sur des agents chimiopréventifs en collaboration avec l'Université Columbia de New York, USA. J'ai aussi participé à la conduite des études de longue durée sur les radiations non-ionisantes, notamment les champs magnétiques à très faible fréquence (50Hz) et à radiofréquence (1800 MHz).

L'utilisation des études de cancérogenèse à long terme sur les rongeurs représente encore aujourd'hui un outil puissant pour l'identification des risques cancérogènes des agents chimiques et physiques présents dans l'environnement du travail et de la vie.

Ces études peuvent permettre de comprendre les mécanismes de cancérogenèse induits par les xénobiotiques et d'identifier les altérations génétiques, épigénétiques et biochimiques corrélées, tels qu'un stress oxydatif, une déficience de la réparation de l'ADN, un déséquilibre entre prolifération cellulaire, apoptose, et communication et signalisation intra- et intercellulaire. L'intégration pluridisciplinaire entre l'expérimentation animale en toxicologie, les techniques d'imagerie médicale et les nouvelles approches moléculaires à haut débit peuvent permettre des progrès importants pour alléger le fardeau global de l'incidence et de la mortalité du cancer du foie.

Eur. J. Oncol., vol. 14, n. 3, pp. 133-150, 2009

Critical reviews/Riviste critiche
General topics/Argomenti generali

Environmental risk factors in primary liver cancer: a review of the literature and perspectives for primary prevention and early detection

Fattori di rischio ambientali nei tumori epatici primitivi: revisione della letteratura e prospettive per la prevenzione primaria e la diagnosi precoce

Davide Degli Esposti*, **, ***, Patrick Pham*, Raphaël Saffroy*, Daniel Azoulay****, Brigitte Debuire*, Antoinette Lemoine*, **

* AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Inserm U602, Institut André Lwoff-IFR89, Université Paris-Sud 11, PRES Universud-Paris, Villejuif Cedex, France
** Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry Cedex, France
*** Cesare Maltoni Cancer Research Centre, Ramazzini Institute of Oncology and Environmental Sciences, Castello di Bentivoglio, Bentivoglio, Bologna, Italy
**** AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Centre Hépatobiliaire, Inserm U602, Institut André Lwoff-IFR89, Université Paris - Sud 11, PRES Universud-Paris, Villejuif Cedex, France

Summary

Primary liver cancer is a major public health problem, accounting for about 600,000 deaths in the world annually, with hepatocellular carcinoma (HCC) accounting for about 80% of all primary tumours in the liver and intra-hepatic cholangiocarcinoma (ICC) representing about 10-15% of the remaining primary hepatic malignancies. Incidence and mortality trends for both HCC and ICC are increasing globally, with particular concern for US and Europe, and survival rates are still very poor. Some risk factors are well-established, such as hepatitis viruses, alcohol intake and aflatoxins exposure for HCC, and infection with liver flukes and primary sclerosing cholangitis for cholangiocarcinoma (CC). However, these known etiologies do not explain the observed increased incidence of

Riassunto

I tumori primitivi maligni del fegato sono un grande problema di salute pubblica, essendo la causa di 600.000 decessi l'anno nel mondo. Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta l'80% di tutti i tumori epatici maligni primitivi, mentre il colangiocarcinoma intra-epatico (ICC) rappresenta circa il 10-15% dei rimanenti tumori epatici maligni. L'incidenza e l'andamento della mortalità per HCC e ICC sono globalmente in aumento, con particolare preoccupazione negli Stati Uniti e in Europa, e i tassi di sopravvivenza sono ancora molto bassi. Alcuni fattori di rischio sono ben stabiliti: i virus dell'epatite, il consumo di alcool e l'esposizione ad aflatossine per l'HCC; le parassitosi da vermi epatici e la colangite sclerosante primaria per il colangiocarcinoma (CC). Tuttavia, queste eziologie conosciute non spiegano l'osservato

Received/Pervenuto 4.5.2009 - Accepted/Accettato 6.7.2009
Address/Indirizzo: Davide Degli Esposti, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Paul Brousse, 94800, Villejuif, France.
Tel. +33 01 45 59 69 06 - Fax +33 01 45 59 36 25 - E-mail: davide.degli-esposti@u-psud.fr; davide.degliesposti@gmail.com

these two malignancies worldwide. Environmental carcinogens could play an underestimated rôle in the increased global burden of primary liver cancers. An essential tool to identify chemical and physical carcinogenic agents is long-term carcinogenicity bioassays, such as those performed by the US National Toxicology Program and the Ramazzini Institute. Although some strains of rodents are reported to be more susceptible to chemical-induced hepatocarcinogenicity, many similarities in histologic, cytological and molecular pathways are shared between humans and rodents in liver tumorigenesis, thus making long-term carcinogenicity bioassays the best available tool for identifying environmental carcinogenic agents, including those targeting the liver. Moreover, early detection of HCC and CC should provide a valuable means to decrease mortality rates in the short term, but reliable biomarkers are not yet available for clinical practice. Advanced technologies such as proteomics and *in vivo* imaging techniques are now available for animal cancer models. Well-designed protocols which will integrate a proteomic approach with imaging diagnostics using animal models may result in greater improvement for biomarkers development in early diagnosis of primary liver cancers. Eur. J. Oncol., 14 (3), 133-150, 2009

Key words: **hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, environmental carcinogens, long-term carcinogenesis bioassays, rodents, biomarkers**

aumento di incidenza di questi due tumori maligni nel mondo. I cancerogeni ambientali potrebbero giocare un ruolo sottostimato nell'aumentata incidenza globale dei tumori primitivi del fegato. Uno strumento essenziale per identificare agenti cancerogeni chimici e fisici sono i saggi di cancerogenicità a lungo termine, come quelli effettuati al National Toxicology Program degli Stati Uniti e all'Istituto Ramazzini. Nonostante sia riportato in letteratura che alcuni ceppi di roditori siano più suscettibili all'insorgenza di epatocarcinomi chimicamente indotti, molte somiglianze istologiche, citologiche e nei meccanismi molecolari sono condivise negli esseri umani e nei roditori per quanto riguarda la cancerogenesi epatica, rendendo così i saggi di cancerogenicità a lungo termine il miglior strumento disponibile per identificare gli agenti cancerogeni ambientali, inclusi quelli che colpiscono il fegato. Inoltre, l'identificazione precoce di HCC e CC potrebbe fornire un mezzo importante per diminuire i tassi di mortalità nel breve periodo, ma nella pratica clinica non sono ancora disponibili biomarcatori affidabili. Tecnologie avanzate, come la proteomica e la diagnostica per immagini *in vivo*, sono ora disponibili per i modelli animali del cancro. Protocolli ben progettati, che integrino un approccio proteomico con la diagnostica per immagini utilizzando modelli animali per il cancro, possono contribuire a un importante miglioramento per lo sviluppo di biomarcatori per la diagnosi precoce dei tumori primitivi maligni del fegato. Eur. J. Oncol., 14 (3), 133-150, 2009

Parole chiave: **carcinoma epatocellulare, colangiocarcinoma, cancerogeni ambientali, saggi di cancerogenicità a lungo termine, roditori, biomarcatori**

Abbreviations

AFB1: Aflatoxin B1
AFP: Alpha-fetoprotein
AHF: Altered hepatic foci
AUROC: Area under receiver operating curve
CC: Cholangiocarcinoma
CT: Computed Tomography
CYP4502E1: Cytochrome P450 2E1
ECC: Extrahepatic cholangiocarcinoma
ER: Estrogen Receptor
HCC: Hepatocellular carcinoma
HBV: Hepatitis B Virus
HCV: Hepatitis C Virus
HTLV-1: Human T-cell lymphotropic virus
ICC: Intrahepatic cholangiocarcinoma
MRI: Magnetic Resonance Imaging
NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease
PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbons
PET: Positron Emission Tomography
PSC: Primary sclerosing cholangitis
VCM: Vinyl chloride monomer

Introduction

Primary liver cancer is a major public health problem, accounting for about 600,000 deaths in the world in 2002 (1). Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for about 80% of all primary cancers in the liver, while intra-hepatic cholangiocarcinoma (ICC), arising from the epithelium of bile ducts located in the liver, represents about 10-15% of the remaining primary hepatic malignancies (2, 3). Hepatoblastoma (a malignant embryonal tumour of the childhood) and hepatic angiosarcoma (arising from blood vessels) account for the remaining 5-10% (2).

In this review we will summarize current epidemiological data on HCC and biliary malignancies, particularly ICC. Biological, dietary and environmental risk factors of these diseases will be reviewed. The rôle of experimental carcinogenicity bioassays in the identification of hepatocarcinogens and of animal models for development of biomarkers for early detection of carcinogenic process in the liver will be discussed.

Epidemiology

Geographic distribution

HCC is the fifth most common cancer worldwide with about 500,000 new cases annually, representing the third most common cause of cancer-related death among men and the eighth in women (1, 4). The geographic distribution of primary liver cancer burden is not even: more than 80% of HCC cases occur in sub-Saharan Africa or Eastern Asia (5) with China accounting for 55% of the world's cases (2). Cholangiocarcinoma (CC) has highest incidence rates in some Asiatic countries, such as Thailand with 96 cases per 100,000 people, about 100 fold with respect to some Western countries (6).

Incidence and mortality trends

Time trends in primary liver cancers may be difficult to interpret due to changes in classification, variable inclusion of metastatic tumours and only recent inclusion of topographical coding for CC distinguishing intrahepatic from extrahepatic CC. However, slight decreases in the HCC incidence in high-rate areas, such as China and Japan, have been reported (7), while a sustained increasing trend has been reported in low-rate countries, particularly the United States and some European countries, such as Italy, France, UK and Germany (2, 5). It merits noting that these increasing trends are associated with younger age groups (2). In the United States HCC incidence rates doubled in the period 1985-2002 with age distribution shifting towards younger age ranges, particularly 45-60 years old, and HCC has become the fastest growing cause of cancer-related death in men (8). Interestingly, it has been reported that in the United States 15-50% of HCC patients had no established risk factors, such as hepatitis viral infections, heavy alcohol consumption or aflatoxin B1 exposure (5). In Europe an analysis of mortality rates from HCC trends in the last 20 years has shown increasing rates for men in 11 countries and for women in 6 countries out of 17 whose data were considered (9). In particular, France and Italy are the countries with the highest mortality rates from HCC for men in the period 2000-2003, with 6.79 and 6.72 deaths/100,000 respectively. In the last 20 years mortality rate per 100,000 men has increased from 3.57 to 6.79 in France and from 5.60 to 6.72 in Italy. Italy is also the first country for mortality rates from HCC for women (1.92 deaths/100,000), while France has 0.96 deaths/100,000. However, mortality rates for women show a decrease from 2.48 to 1.92 per 100,000 women in Italy and an increase from 0.69 to 0.96 per 100,000 women in France in the last same period (9).

With regard to biliary malignancies, ICC and extra hepatic CC (ECC) show different epidemiologic features: ICC incidence and mortality are increasing worldwide, while those of ECC are slightly decreasing (3). A US study using data from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program has shown that incidence trends in ICC more than doubled approximately between 1976 and 2000 (10). Similar results have been shown in another study which reported a 165% increase in ICC incidence comparing the period 1975-1979 to 1995-1999 (6). ICC incidence and mortality rates are also increasing in most European countries: in the last decades trends in mortality rates show an

increase in 13 out of 15 analyzed countries for both men and women (11). In particular England-Wales and Scotland showed the highest mortality rates for both men and women: 0.83 (men) and 0.63 (women) deaths/100,000 and 1.17 (men) and 1.00 (women) deaths/100,000 respectively. The percent increase is 315% for men and 271% in women in England-Wales comparing 1979-1981 with 1995-1997, while in Scotland this increase is 216% for men and 335% for women in the same period (12).

Survival

Survival rates for HCC after 5 years are still very poor also in developed countries, as low as 8% in the United States, 10% in Italy and 9% in France (2, 13, 14). Survival rates for CC are also very poor, ranging 2-7%, although early diagnosis may allow surgical resectability of small or little infiltrating malignancies, thus increasing 5-years survival rates to 25-30% (15-18).

Biological risk factors

Hepatitis B (HBV) and C (HCV) infections have been reported to be associated with over 80% of HCC in the world (19). It has been estimated that HBV carriers have more than 100-fold increased risk of HCC compared with non-infected individuals (20). HCV infection is a more important risk factor for HCC than HBV in Western countries and Japan. HCV infection markers have been detected in variable proportions of patients in Italy (44-66%) (21), France (27-58%) and Spain (60-75%). HCV-associated HCCs have been reported as high as 80-90% in Japan (22). Different mechanisms of carcinogenesis are associated to HBV and HCV infections. HBV is a known oncogenic virus, able to integrate its DNA into the genome of the infected cells causing direct mutagenesis, and higher rates of chromosomal abnormalities have been found in HBV-related HCC (23, 24). HCV virus seems to cause HCC through an indirect pathway causing chronic inflammation, cell death, proliferation and cirrhosis (20). However, HBV virus also seems to promote liver carcinogenesis through indirect pathways by continuous hepatocyte injury, liver regeneration and tumour-promoting activities of viral proteins, like Hbx (20). It is interesting to note that a recent epidemiological study (25) found an association between a leukemogenic virus infection, HTLV-1, and an increased risk of HCC (RR=2.1; 95% C.I: 1.0-4.6). Although confounding factors due to interactions between HCV and HTLV-1 infections has been pointed out as a partial explanation of these data, further studies are warranted to explore these findings.

Etiology and risk factors for CC are much less known compared to HCC ones. Some inflammatory diseases of biliary or gastrointestinal tract are associated with an increased risk of CC, notably gallstones, chronic ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis (PSC) (26, 27). PSC has been indicated as the most common cause of CC in Western countries, but since its incidence has not increased in the last decade it cannot explain the observed increased incidence of CC (3, 6). In Eastern Europe and in many Asian countries an important etiologic factor of CC is infection with liver flukes (*Opistorchis spp.*, *Clonorchis sinensis*) which contaminated raw food, particularly fish (28). A 1994 WHO estimate reported about 17 million people globally infected with CC-related liver flukes (29). HCV infection was also associated with higher risk of developing ICC in the United States (30), but still most patients with CC have no identifiable risk factors for the disease.

Dietary risk factors

Excessive alcohol intake (more than 3 drinks/day corresponding roughly to 35-40 g ethanol/day) has been recognized as human carcinogen by IARC in 1988 (31). Ethyl alcohol is a multipotent carcinogenic agent and has been causally associated not only to liver cancer, but also to other cancer sites (oral cavity, pharynx, larynx, esophagus, liver, colorectum and female breast) (32). Ethyl alcohol in drinking water has also been demonstrated to be carcinogenic in experimental animals (33).Various mechanisms seems to act in alcohol-associated carcinogenesis: chronic inflammation resulting in oxidative stress, as in steatohepatitis; acetaldehyde formation (by liver alcohol dehydrogenase and

cytochrome P4502E1, CYP2E1) and its consequent mutagenic and carcinogenic effects; induction of CYP2E1 causing increased reactive oxygen species (ROS) formation and subsequent lipid peroxidation and DNA damage; depletion of cellular antioxidant defense pool (glutathione and alpha-tocopherol); disturbed methyl group transfer associated with DNA hypomethylation; decrease retinoic acid in the liver with induction of AP-1 complex, the latter being a downstream effector of tumour promoters, oncogenes and growth factors; and iron overload, due to increased intestinal uptake and hepatic deposition, promoting ROS formation through the Fenton reaction (34).

Aflatoxins are known and potent hepatocarcinogens in both animals and humans (35). These mycotoxins are produced by *Aspergillus flavus* and related fungi on improperly stored corn, rice and peanuts. Sub-Saharian and Eastern/Southeastern populations are highly exposed (2). Little information is available on correlation between aflatoxins and HCC in developed countries, but it merits noting that aflatoxins adducts have been identified in a small sample of patients in the United States (36). Many ecological studies performed between the 1960s and 1980s showed aflatoxins induced HCC in exposed populations (37-39). Many studies in rats have also demonstrated the carcinogenicity of aflatoxins: a dose-related increased of hepatomas were firstly shown by Newberne (40). Hepatocarcinogenicity of aflatoxins was later confirmed by several studies in different rodent species and strains (39, 41, 42). Aflatoxin B1 (AFB_1) is the standard reference for mechanistic studies on aflatoxins carcinogenicity. AFB_1 is metabolically activated in the liver by cytochrome P450 oxidation, forming the AFB_1 exo-8,9-epoxide that reacts covalently with DNA and also with proteins (43). The most frequently observed mutation induced by metabolically activated AFB_1 is GC→TA transversion. In particular, in the specific case of AFB_1-induced HCC, a striking sequence specificity has been observed as most of the mutations are found in the third position of codon 249 of p53 gene (44). AFB_1 reactivity is particularly strong towards guanine bases although it also depends on local DNA sequence (45-46). It is also speculated that the observation of the hotspot mutation site in the p53 gene is due to a selective advantage for growth of already mutated hepatocytes, as it has been suggested that AFB_1 exert a major effect on late-stage carcinogenesis (46).

Recently, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a metabolic disorder characterized by steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) frequently leading to fibrosis and finally evolving in cirrhosis, has been proposed to increase HCC risk (47). However, in an experimental model of NAFLD, mice exposed to particulate matter PM<2.5 µm develop more severe liver inflammation and fibrosis compared to non exposed mice (48). It is worth noting that in a series of 105 consecutive patients in the United States, cryptogenic cirrhosis accounted for 29% of diagnosed HCC and NAFLD might underlie 13% of total HCC patients for whom neither HCV/HBV infections nor heavy alcohol intake is reported (49). NAFLD is strongly associated with caloric overconsumption, obesity and diabetes, the latter of which is found to be a risk factor for both chronic liver disease and HCC (4, 50).

Concerning CC, few data on dietary risk factors have been reported. Excess alcohol consumption was recently found higher in ICC compared to controls in a case-control study (51). Further experimental and epidemiologic research on food contaminants such as additives or pesticides is warranted to analyse diet influences on CC onset.

Chemical risk factors

An analysis of the data reported by the IARC monographs on the 108 agents classified as human carcinogens (class 1) shows that 17 (about 16%) are causally associated or suspected hepatocarcinogens (Table 1). Among these, viruses such as HBV, HBC and HTLV-1 have already been discussed briefly, as the examples of ethanol in alcoholic beverages and aflatoxins exposure in contaminated foods.

Different classes of chemicals are reported to induce HCC in humans: drugs or hormonal therapies (azathioprine, tamoxifen and estrogen-progesteron oral contraceptives) (68); radioisotopes or heavy metals (Plutonium-239, Radium-224, Thorium-232; arsenic in drinking water) (57, 65); complex mixtures of PAH and other combustion products

Table 1 - Chemical, physical and biological agents recognized or suspected as hepatocarcinogens to humans

Agent/mixture/ exposure situation	Type of agent	Liver cancer (level of evidence)	Other cancer sites in humans	Data on rodent carcinogenicity		References
				Liver	Other sites	
Azathioprine	Immunosuppressant drug	Causally associated	Hematopoietic tissue, skin	Not reported	Hematopoietic tissue, ear duct	IARC Suppl. 7 (52), Cohen *et al* (53)
Estrogen-progesteron oral contraceptives	Hormones	Causally associated	Female breast, cervix	Causally associated	Mammary gland, uterus	IARC Vol 91 (54)
Ethanol in alcoholic beverages	Alcohol	Causally associated	Oral cavity, pharynx, larynx, esophagus, colorectum, female breast	Causally associated	Head (osteosarcomas), neck, mammary gland	IARC Vol 96 (32); Soffritti *et al* (33)
Hepatitis B virus	Virus	Causally associated	Not reported	Suspected to be associated[a]	Not reported	IARC Vol 59 (55)
Hepatitis C virus	Virus	Causally associated	Not reported	Not reported	Not reported	IARC Vol 59 (55)
Human T-cell lymphotropic virus type I	Virus	Suspected to be associated	Adult T-cell leukemia/ lymphoma, cervix, vagina	Not reported	Not reported	IARC Vol 67 (56)
Plutonium-239	Alpha particle emitter	Causally associated	Lung, bone sarcoma	Causally associated	Lung, bones	IARC Vol 78 (57)
Radium-224	Alpha particle emitter	Causally associated	Bone sarcoma, female breast, kidney	Not reported	Bones, hematopoietic tissue	IARC Vol 78 (57)
Thorium-232	Alpha particle emitter	Causally associated	Leukemia	Causally associated	Bones	IARC Vol 78 (57)
Tamoxifen	Hormone agonist/ antagonist	Suspected to be associated	Endometrium	Causally associated	Uterus	IARC Vol 66 (58); Maltoni *et al* (59)
2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-para-dioxin	Organochlorine	Suspected to be associated	Lung, hematopoietic tissue, soft tissues sarcomas, all cancers combined	Causally associated	Thyroid, subcunateous and hematopoietic tissue	IARC Vol 69 (60), Walker *et al* (61)

(continued)

Table 1 - *(continued)*

Agent/mixture/ exposure situation	Type of agent	Liver cancer (level of evidence)	Other cancer sites in humans	Data on rodent carcinogenicity		References
				Liver	Other sites	
Vinyl chloride	organochlorine	Causally associated	Suspected brain, hematopoietic tissue, melanoma	Causally associated	Skin, mammary gland, Zymbal gland, lung, kidney	IARC Vol. 97 (62)
Aflatoxins	Mycotoxins	Causally associated	Not reported	Causally associated	Not reported	IARC Vol. 82 (63)
Betel quid with or without tobacco	Plant derivatives	Suspected to be associated	Oral cavity, pharynx, esophagus	Suspected to be associated	Skin, lung, stomach	IARC Vol. 85 (64)
Soots	PAH and combustion products mixtures	Causally associated	Esophagus, lung, leukemia	Not reported	Skin, lung	IARC Suppl 7 (52)
Arsenic in drinking water	Heavy metal	Suspected to be associated	Skin, lung, kidney, urinary bladder	Causally associated	Skin, lung, urinary bladder	IARC Vol. 84 (65), Waalkes *et al* (66)
Tobacco smoking and tobacco smoke	PAH and combustion products mixtures	Causally associated	Oral and nasal cavities, esophagus, pharynx, larynx, lung, stomach, pancreas, kidney, urinary tract, cervix, hematopoietic tissue	Suspected to be associated	Skin, respiratory tract, lung	IARC Vol. 83 (67)

[a] results were obtained in transgenic mice expressing pre-S, S and X genes of HBV genome and the relevance of these studies is not clear

(soots and tobacco smoking) (52, 67); organochlorines (vinyl chloride monomer: VCM) (62); and plants (betel or *Areca catechu*) (64). For many of these compounds carcinogenicity studies on rodents anticipated or confirmed specific liver tumour induction. It is interesting to note that recently also some psychoactive substances, like cannabinoids, have been reported to worsen liver steatosis and fibrosis in presence of HCV infections (69-71). Despite that no evidence of carcinogenicity has been shown for delta 9-tetrahydrocannabinol (the principal psychoactive ingredient in marihuana) in rats and mice (72), more research is warranted to assess long-term carcinogenicity effects of cannabinoids, particularly in the liver, as their assumption during cannabis smoking may result in cannabinoids exposure for a large population. Moreover, some natural and synthetic cannabinoids have been recently tested for therapeutic applications, such as control of chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients (73, 74), appetite stimulation for AIDS patients (74), and control of mood disorders (75). Thus, evaluation of potential cannabinoids carcinogenicity should be addressed to verify their safety as drugs.

Estrogen-progesteron oral contraceptives have been shown to induce liver tumours in women in many case-control studies (54). Carcinogenicity studies on rats showed that oral administration of ethinyl estradiol plus norethisterone to male and female rats induced increased incidence of liver adenomas in treated males and HCC in treated females (54) and that oral administration of mestranol plus norethisterone induced increased

incidence of liver adenomas in treated male rats (54). Another study showed that administration of mestranol plus norethynodrel induced an increased incidence of AHF in female rats (54). Estrogen-progesteron oral contraceptives carcinogenicity may be mediated by promotion of the epithelium proliferation and by the generation of ROS caused by estrogen reactive metabolites (76).

Human exposure to alpha-particle emitters, in particular Plutonium-239, Radium-224, Thorium-232, has been associated to increased incidence of HCC (57). Recently a 17 month-long study on mice showed that a short period of exposure to Thorotrast (Thorium-232 dioxide) increased the incidence of altered hepatic foci in treated mice (77). A mechanistic explanation is that during their decay radioisotopes emit alpha particles which have been shown to induce direct and indirect DNA damage (78).

Some cases of HCC following tamoxifen treatment in breast cancer patients have been reported (58, 68). Even though no strong statistical association was shown with HCC, clear carcinogenic effects were shown for endometrial cancers. Interestingly, in a 2-year carcinogenicity bioassay, oral administration of tamoxifen to male and female Alderley Park Wistar derived- rats induced an increased incidence of liver adenomas and carcinomas in both sexes (79). Tamoxifen possesses a partial estrogen-agonist activity in the liver (58). Human hepatic estrogen receptor (ER) appears to be quantitative and qualitative similar to that of rodents, so tamoxifen-induced liver tumours in humans and rodents may be due in part to ER-dependent responses, such as hepatocytes mitogenesis (80).

VCM induces increased incidences of hepatic angiosarcomas and hepatocellular carcinomas in humans, as shown in many studies (62, 81-83). However, the first evidence of hepatic angiosarcoma induced by VCM comes from a long-term carcinogenicity study performed in the early 1970s (84, 85) and further experiments showed that VCM induced also HCC and other cancers in rats (85). VCM is predominantly oxidized by the cytochrome P4502E1 and, following metabolic activation, the two metabolites (chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde) react with nucleic acid bases to form adducts (62). Furthermore, the molecular pattern of p53 mutations has been shown to be similar in Sprague-Dawley rat primary liver tumours (both angiosarcomas and hepatocellular carcinomas) compared to human liver cancers (86).

Ecological studies performed in areas where drinking water was contaminated by various levels of arsenic (As) have shown increased incidence of different kind of malignancy in exposed population, particularly tumours of skin, lung, liver, kidney and urinary bladder (87-89). In a transplancetal study on CH3 mice, inorganic As was shown to induce a dose-related increase in the incidence of HCC in males (66). Arsenic is genotoxic and induces chromosomal aberrations both *in vitro* and *in vivo* (55, 65).

Interestingly, some chemical agents associated with increased risk for HCC have been reported to be carcinogenic also for the biliary tract in humans. In an epidemiological study on chemical workers vinyl chloride was associated with increased risk of CC (90). Thorotrast, used as a radiocontrast agent in 1930s, has been reported to be a potent carcinogenic agent for CC (91). Furthermore, dioxins and nitrosamines have been associated to increased risk for CC in humans (92). Importantly 3 different kinds of dioxins (2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 3,3´,4,4´,5-pentachlorobiphenyl and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran) have been recently demonstrated to induce a dose-related increase in both HCC and CC incidence in Sprague-Dawley rats in a 2-year carcinogenicity assay (61).

Many genetic epidemiologic studies have been conducted to evaluate gene polymorphisms and gene-environment interactions as risk factors for HCC, particularly concerning genes coding for metabolizing enzymes (glutathione-S-transferase, epoxide hydrolase, cytochrome P4502E1) or DNA repairing enzymes (XRCC1, UDP-glucuronosyl-transferase1A7) (93-98). Until now, results from these studies have reported positive association, association in a subset of population or negative association. These results have been attributed to inadequate sample size to reliably detect likely small effects of single genes on risk with a background of strong environmental factors (5). Meta-analysis and additional studies with larger samples should clarify the rôle of genetic polymorphisms in the onset of HCC (5, 99).

These data clearly indicate that the human liver is sensitive to chemical-induced carcinogenesis and that xenobiotic exposure could play an underestimated rôle in inducing primary liver cancers, alone or in addition to viral and alcoholic etiologies. Although it is aknowledged that in some rodents, particularly in mice, the liver is a preferred target organ for chemical carcinogens (100, 101), it should not be disregarded that some human hepatocarcinogens such as aflatoxins, VCM, oral contraceptives, tamoxifen have been anticipated as such in rodents and that molecular events in tumorigenesis appear to be similar. Even though mouse liver susceptibility to tumorigenesis is often used as an argument against the relevance of carcinogenic bioassays for public health protection, this biological feature should be considered as a *de facto* sensitivite biosensor, as about one third of human carcinogens (IARC group 1) induce HCC in mice (102). Finally, only a small fraction of the about 100,000 chemical agents presently commercialized in Europe and United States have been adequately investigated for their carcinogenic potential, so the chemical burden for hepatocarcinogenesis could be greater than actually estimated (103, 104).

Long-term carcinogenicity bioassays and detection of potential human hepatocarcinogens

Long-term carcinogenicity bioassays, particularly using rats and mice, have been traditionally employed for detecting the carcinogenic potential of chemical and physical agents by the two most extensive bioassays programs in the world, the National Toxicology Program and the Ramazzini Institute (105-107). Although the etiology of hepatic neoplasias is different, in particular due to the absence of chronic hepatitis as a precursor in spontaneous HCC in rodents, histologic, cytological and molecular similarities have been identified between humans and rodents with respect to liver neoplasia (107).

In both humans and rodents HCC are frequently multifocal and show a histologic/cytological spectrum from well-differentiated to poorly-differentiated carcinomas (101). Histological patterns of HCC show various similarities between humans and rodents, as they may be organized in multicellular trabeculae, solid mass or gland-like arrangements (108-111). Furthermore, some histochemical abnormalities are shared between rats and humans, such as decreased activity of ATPase and glucose 6-phosphatase and increased activity of gamma-glutamyltranspeptidase (112).

One of the suggested pathogenic pathways involved in development of HCC is the proliferation of oval cells, considered the stem cells of the adult liver (113). Oval cell proliferation may lead to the formation of atypic hepatic foci (AHF), whose progression towards hepatic neoplasias has been extensively studied in rodents (114-116). AHF has also been indicated as a preneoplastic lesion associated with human HCC development (117).

The molecular pathways involved in the development of liver neoplasia are diverse in both humans and rodents and no universal molecular features have been found associated with all hepatic tumours in both species. In humans, alterations in mainly four different genetic pathways have been identified: the p53 pathway involved in response to DNA damage; the retinoblastoma (Rb) pathway involved in cell cycle control; the TGF-β pathway involved in growth inhibition; and the Wnt/ β-catenin involved in signal transduction and cell-cell adhesion (23, 118, 119). Specific p53 mutations, particularly GC→TA transversions, have been shown after aflatoxin and VCM exposure both in humans and rodents HCC, although p53 mutations in HCC are less frequent in rodents than in humans (86, 120). Other mutations in the p53 gene have been identified in humans, but its overall mutation rate is geographically heterogeneous, ranging from 15% in European HCC to 40% in Chinese HCC (121, 122). It is worth noting that hepatoblastomas have been reported to carry p53 alterations in both children and mice, although in rodents this is a tumour occurring in adult animals (123-125). The Rb gene, an oncosuppressor gene involved in regulation of the G1 phase of the cell cycle and its inactivation, exhibits either gene mutation or epigenetic alterations in about 30% of human HCC (23, 126). Epigenetic silencing through promoter methylation is also observed in another Rb pathway gene, p16-INK4, leading to the repression of cyclin D-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2) and ARF (two tumour

suppressor proteins), in a wide range of HCC (127). In a folate/methyl deficiency model, inducing HCC in rats, methylation of p16 gene promoter has been found to be an early event in hepatocarcinogenesis, suggesting that the Rb pathway is shared by human and rodents in certain conditions and that folate/methyl deficiency model is a suitable experimental model to study Rb pathway implications in hepatic multi-stage carcinogenesis, particularly linked to alterations in DNA methylation (128). Transforming growth factor β (TGF-β), a peptide hormone which controls proliferation and induces apoptosis in hepatocytes, may also play a rôle in early events during hepatocarcinogenesis in both humans and rodents (101, 129). Expression of a co-receptor required for its activation, the mannose-6-phosphate/insuline-like growth factor 2 (M6P/IGF2R), has been found decreased in human and rodent HCC (130, 131). Interestingly, in mice and rats, the M6P/IGF2R gene is imprinted, meaning that just one copy is functional. This fact may partially explain the relatively higher susceptibility of rodents for chemically-induced liver cancers (107, 131). β-catenin is a protein with a dual function in cell-cell adhesion and in Wnt signaling that induces cell proliferation. Point mutations leading to the loss of phosphorylation sites of β-catenin alter its cellular degradation, with consequently protein translocation to the nucleus and transcription of genes, including c-myc, whose upregulation leads to cell proliferation (132). β-catenin mutations seems to be an early event, as they have been found in liver adenomas and in patients with non-invasive hepatocellular carcinoma (133, 134). β-catenin mutations have been also found in chemically-induced mouse HCC, with immunohistochemical accumulation in premalignant liver lesions, suggesting that Wnt signaling pathway is an early event in liver carcinogenesis also in mice alterations and that this pathway may be sensible to chemical carcinogens (135).

CC is a very rare malignancy in rodents. NTP historical controls show CC incidence ranges in Fischer rats from 0-0.1% in males and from 0-0.2% in females, while in B6C3F1 mice it ranges from 0-0.7% in males and from 0-2% in females (136). However, rodent biliary epithelium seems to be sensible to chemical-induced carcinogenesis, as shown by recent long-term carcinogenicity studies on dioxins (61). Moreover an experimental model of thioacetamide-induced ICC in Sprague-Dawley rats has been recently developed (137, 138). A pathological and immunohistochemical study provided evidence that thioacetamide induces the entire range of cholangiocarcinogenesis lesions, from dysplasia to advanced cancerous stage and expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), apomucins and matrix metalloproteinases is similar in human and rat ICC (139).

Although different in etiology, taken together there are a number of similarities in both hystologic aspects and cellular and molecular pathogenesis between humans and rodents concerning the development of primary liver neoplasias. Given that the use of long-term bioassays is a well-established - and currently the most predictive - tool to detect chemical and physical carcinogens, it represents the best experimental surrogate available for detecting potential human hepatocarcinogens.

Animal models for development of novel liver cancer biomarkers

HCC screening is proposed for high risk populations and consists in hepatic ultrasound scanning coupled with serum α-fetoprotein (AFP) assay (140). The use of biological markers for early detection of HCC is currently problematic due to the relatively poor sensitivity of available markers (119, 141). In particular, AFP accounts for a sensitivity ranging from 39% to 64% and a specificity ranging from 76% to 91% (142-143). Moreover, AFP correlates with tumour size and 80% of HCC with tumour diameter < 3 cm do not show increase in AFP serum levels (119, 140, 144). Various serum markers have been proposed to improve HCC detection, such as *Lens culinaris* agglutinin-reactive AFP (AFP-L3); des-gamma carboxyprothrombin (DCP), α-l-fucosidase (AFU), glycopican 3 (GPC3), squamous cell carcinoma antigen (SCCA) and Golgi protein 73 (GP73) (141). None of these proteins has shown enough sensitivity nor specificity to be proposed as unique biomarker to detect early HCC. Many efforts have been dedicated and some improvements obtained by combining two or more of these proteins (145-149), but currently there is not enough data on

their diagnostic accuracy to allow for clinical application, particularly for early detection of HCC. However, it is of note that recently a set of six different serum biomarkers adjusted for age and sex (α-2 microglobulin, haptoglobulin, γ-glutamyl transpeptidase, total bilirubin, apolipoprotein A1 and alanine transferase) has been developed and tested for non-invasive evaluation of liver fibrosis and necrosis in patients with HVC infection, with inter-center reproducibility and with an area under receiver operating curve (AUROC) of 0.87 (150-152). Recently, the association of this set of biomarkers with an ultrasound-based transient elastography has been shown to allow diagnosis and reliable grading of liver fibrosis, avoiding liver biopsy in a significant percentage of patients (153, 154). The same group proposing the panel of biomarkers for evaluating liver fibrosis and necrosis has combined this panel of biomarkers with serum glucose, triglycerides and cholesterol levels and body mass index to evaluate steatosis, obtaining AUROCs ranging from 0.79 to 0.86 (155), even though a comparison with Magnetic Resonance Imaging has shown the latter still being the best method for highly accurate non invasive measurement of liver steatosis (156).

Recent advances in global genomic and proteomic approaches could help improve early diagnostic of primary liver cancers. DNA microarrays allow simultaneous analysis of thousands of genes and will probably amplify the discovery of new markers, but standardization and interpretation difficulties are currently limiting the use of these methods in clinical practice. Serum proteomics using surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) has been recently used to develop new HCC biomarkers (157). A study comparing sensitivity and specificity of SELDI-TOF MS with AFP, AFP-L3 and DCP showed higher sensitivity and specificity for the proteomic analysis (158). There are different strategies for the search of protein biomarkers, including analysis of pathologic tissue, identification of tumour antigens that induce autoantibodies directed against HCC antigens, but the most interesting for potential early diagnosis is analysis of serum of other biological fluids. Beretta reports that although many technical advances have been achieved, some basic questions remain to be answered, particularly the lack of information on differences in plasma proteome in healthy subjects differring for sex and age and the specific design of studies aimed to detect early neoplastic lesions which cannot be diagnosed with available tools (159).

In this context, the use of experimental models of HCC and CC could provide a valuable platform for development and validation of new biomarkers. In particular, the collection of biological fluids is feasable throughout the life of animals, before and after they may develop a neoplasia during long-term carcinogenicity bioassays, notably life-span experiments (106, 160). This approach combines the possibility of both prospective and retrospective analysis of plasma and urine, allowing the identification of promising biomarkers for early detection of cancer. Furthermore, life-span carcinogenicity bioassays provide access to a larger number of samples (at least 100 animals/group) compared to clinical studies, thus reducing the effect of chance in detecting a potential candidate molecule (161). The human homologues of the most predictive biomarkers identified experimentally could be tested in clinical and population studies, possibly reducing costs and time of clinical research and increasing successful identification of useful biomarkers. In recent years, *in vivo* imaging methods, such as ultrasound, Magnetic Resonance Imaging (MRI), Computed Tomography (CT) and Positron Emission Tomography (PET), have improved, allowing high spatial resolutions, informative metabolic, functional and molecular information also in laboratory animals (162, 163). Use of these imagining methods is rapidly growing in physiopathological and drug discovery studies in preclinical models. Furthermore, algorithms have been developed that superimpose information obtained from different imaging devices such as CT, PET or MRI, allowing additional spatial and quantitative data (164). Well-designed protocols which will integrate proteomic approach with imaging diagnostics using animal models of cancer may result in greater improvement for biomarkers development.

Many experimental models of preneoplastic and neoplastic liver lesions are already available in rodents. Liver fibrosis and cirrhosis can be induced in rats by treating them with carbon tetrachloride or phenobarbital or a combination of both, reproducing

the development of cirrhosis in human livers (165, 166). These models are currently used in testing new potential antifibrotic agents and they could provide a valuable model for early detection biomarkers research since rats, like humans, may develop HCC in cirrhotic livers (167). Diethylnitrosamine (DEN) also induces HCC in exposed rats and provides a widely used model to study mechanisms of hepatocellular carcinogenesis (168-170), so it has potential to be exploited for biomarkers development. Rodent models of NASH, recently proposed as a risk factor for HCC (47), are also available. These include genetic models and diet-induced NASH. Genetic models such as ob/ob mice (leptin-deficient) or phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice, have been shown to be more prone to develop HCC, thus renforcing the hypothesis that NASH can represent a precancerous lesion in the liver (171, 172). Diet-induced NASH, like in the case of methionine-choline deficient feeding in both rats and mice, are providing valuable results in understanding biochemical and molecular pathological processes underlying onset and progression of NASH (173, 174).

As previously described, a chemical-induced model of CC treating rats with thioacetamide is also available. Although the capacity of thioacetamide to induce CC has been known since the mid-1980s (175), its use to study mechanisms of CC tumorigenesis and drug discovery is quite recent (137, 176). This model opens new possibilities to explore markers for CC, for which early detection could improve clinical and surgical management of the disease and possibly survival.

Conclusions

Primary liver cancers, particularly HCC and CC, are an increasing public health problem in both developed and developing countries (1, 2). Although viral and alcoholic etiologies seem to account for most HCC, recent evidence show that an increasing fraction of HCC arise in people having no recognized risk factors (5, 49). Furthermore, the recent increase in the incidence of CC is likely to be of environmental origin, as other known risk factors do not appear to have increased in the last decade (6). Long-term carcinogenicity bioassays on rodents are the best available tool to study the carcinogenic potential of chemical and physical agents and provide a unique resource to improve primary prevention of cancer in general and also of liver cancers (106, 107, 160). The fact that some rodents, particularly mice, have a higher susceptibility for developping HCC should not be considered as a shortcoming in long-term carcinogenicity studies, but rather as an available sensitive biosensor for detecting carcinogenic potential. Furthermore, animal models are now available to develop and validate early detection or exposure biomarkers for liver neoplasia or hepatocarcinogens. More research and well-designed protocols are needed to integrate long-term carcinogenicity bioassays and exposure/early detection biomarkers research in order to decrease the global burden of cancer incidence and mortality.

Acknowledgements

The Authors thank Kathryn Knowles for her support in the preparation of the manuscript.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al*. Global cancer statistics 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.
2. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008. Lyon: IARC Press, 2008.
3. Ustundag Y, Bayraktar Y. Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature. World J Gastroenterol 2008; 14: 6458-66.
4. Parkin DM. Cancer incidence in five continents. IARC scientific publications Vol. VIII, No. 155. Lyon: IARC Press, 2002.
5. El-Serag H, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology 2007; 132: 2557-76.
6. Shaib Y, El-Serag H. The epidemiology of cholangiocarcinoma. Semin Liver Dis 2004; 24: 115-25.
7. McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, *et al*. International trends and pattern of primary liver cancer. Int J Cancer 2001; 94: 290-6.
8. El-Seragh HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. Gastroenterology 2004; 127 Suppl. 5: S27-S34.
9. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, *et al*. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. Hepatology 2008; 48: 137-45.

10. McGlynn KA, Tarone NE, El-Seragh HB. A comparison of trends in the incidence of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15: 1198-203.
11. Patel T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. BMC Cancer 2002; 2: 10.
12. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, *et al*. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. J Hepatol 2002; 37: 806-13.
13. Associazione Italiana Registri Tumori. I Tumori in Italia - Rapporto 2007. Epidemiologia e Prevenzione 2007, Suppl. 1: 46.
14. Bossard N, Velten M, Remontet L, *et al*. Survival of cancer patients in France: A population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). Eur J Cancer 2007; 43: 149-60.
15. Baton O, Azoulay D, Adam DV, *et al*. Major hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma type 3 and 4: prognostic factors and longterm outcomes. J Am Coll Surg 2007; 204: 250-60.
16. Borie F, Niampa H, Bouvier AM, *et al*. Current management and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma in France. Gastroenterol Clin Biol. In press. [in French].
17. Forsmo HM, Horn A, Viste A, *et al*. Survival and an overview of decision-making in patients with cholangiocarcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2008; 7: 412-7.
18. Konstadoulakis MM, Roayaie S, Gomatos IP, *et al*. Fifteen-year, single-center experience with the surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma: operative results and long-term outcome. Surgery 2008; 143: 366-74.
19. Mc Glynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005; 19: 3-23.
20. But DYK, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma.World J Gastroenterol 2008; 14: 1652-6.
21. Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, *et al*. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. J Hepatol 2001; 34: 748-55.
22. Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. Oncology 2002; 62(Suppl 1): 8-17.
23. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, *et al*. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. Gastroenterology 2001; 120: 1763-73.
24. Brechot C, Pourcel C, Louise A, *et al*. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. Nature 1980; 286: 533-5.
25. Arisawa K, Soda M, Akahoshi M, *et al*. Human T-cell lymphotropic virus type-1 infection and risk of cancer: 15.4 year longitudinal study among atomic bomb survivors in Nagasaki, Japan. Cancer Sci 2006; 97: 535-9.
26. Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. Gastroenterology 2005; 128: 1655-67.
27. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, *et al*. Cholangiocarcinoma. Lancet 2005; 366: 1303-14.
28. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter Pylori. Lyon: IARC, 1994.
29. World Health Organisation. Control of Foodborne Nematode Infections. WHO Tech. Rep. Ser. Geneva: WHO, 1994.
30. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, *et al*. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study. Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5: 1221-8.
31. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 44. Alcohol drinking. Lyon: IARC, 1988.
32. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 96. Ethanol in alcoholic beverages. Lyon: IARC, in press.
33. Soffritti M, Belpoggi F, Cevolani D, *et al*. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of methyl alcohol and ethyl alcohol in rats. Ann N Y Acad Sci 2002; 983: 46-69.
34. Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. Biol Chem 2006; 387: 349-60.
35. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res 1992; 52: 2114S-8S.
36. Hoque A, Patt YZ, Yoffe B, *et al*. Does aflatoxin B1 play a role in the etiology of hepatocellular carcinoma in the United States? Nutr Cancer 1999; 35: 27-33.
37. Alpert ME, Hutt MS, Wogan GN, *et al*. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. Cancer 1971; 28: 253-60.
38. Wang YB, Lan LZ, Ye BF, *et al*. Relation between geographical distribution of liver cancer and climate-aflatoxin B1 in China. Sci Sin B 1983; 26: 1166-75.
39. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 56. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993.
40. Newberne PM. Carcinogenicity of aflatoxin-contaminated peanut meals. In Wogan GN: Mycotoxins in foodstuffs. Cambridge, MA: MIT Press, 1965, 187-208.
41. Butlers WH, Barnes JM. Carcinogenic action of

groundnut meal containing aflatoxins in rats. Food Cosmet Toxicol 1968; 6: 135-41.
42. Wogan GN, Paglialunga S, Newberne PM. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. Food Cosmet Toxicol 1974; 12: 681-5.
43. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, *et al*. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. Carcinogenesis 2001; 22: 535-45.
44. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, *et al*. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. Nature 1991; 350: 427-8.
45. Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD, *et al*. Mapping the binding site of aflatoxin B1 in DNA: systematic analysis of the reactivity of aflatoxin B1 with guanines in different DNA sequences. Biochemistry 1988; 27: 472-81.
46. Puisieux A, Lim S, Groopman J, *et al*. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. Cancer Res 1991; 51: 6185-9.
47. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and rôle of the adipose tissue in the pathogenesis of non fatty liver disease. World J Gastroenterol 2007; 13: 3540-53.
48. Tan HH, Fiel MI, Sun Q, *et al*. Ambient air particulate matter exposure exacerbates non-alcoholic fatty liver disease. Immunotoxicology. In press.
49. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, *et al*. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. Hepatology 2002; 36: 1349-54.
50. Yuan JM, Govindarajan S, Arakawa K, *et al*. Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S. Cancer 2004; 101: 1009-17.
51. Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, *et al*. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case-control study. Am J Gastroenterol 2007; 102: 1016-21.
52. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Suppl. 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon: IARC, 1987.
53. Cohen SM, Erturk E, Skibba JL, *et al*. Azathioprine induction of lymphomas and squamous cell carcinomas in rats. Cancer Res 1983; 46: 2768-72.
54. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 91. Combined estrogen-progesteron contraceptives and combined estrogen-progesteron menopausal therapy. Lyon: IARC, 2007.
55. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Hepatitis viruses. Vol. 59. Lyon: IARC, 1994.
56. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 67. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotrophic viruses. Lyon: IARC, 1996.
57. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 78. Ionizing radiation part 2: some internally deposited radionucleotides. Lyon: IARC, 2001.
58. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 66. Some pharmaceutical drugs. Lyon: IARC, 1996.
59. Maltoni C, Minardi F, Pinto C, *et al*. Results of three life-span experimental carcinogenicity and anticarcinogenicity studies on tamoxifen in rats. Ann NY Acad Sci 1997; 837: 469-512.
60. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 69. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Lyon: IARC, 1997.
61. Walker NJ, Crockett PW, Nyska A, *et al*. Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "dioxin-like compounds". Environ Health Perspect 2005; 113: 43-48.
62. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 97. 1,3-Butadiene, ethylene oxide, and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride, vinyl bromide). Lyon: IARC, 2008.
63. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 82. Some traditional herbal medicine, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon: IARC, 2002.
64. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 85. Betel quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines. Lyon: IARC, 2004.
65. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 84. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Lyon: IARC, 2004.
66. Waalkes MP, Ward JM, Liu J, *et al*. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2003; 186: 7-17.
67. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 83. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: IARC, 2004.

68. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 100. A review of human carcinogens. Lyon: IARC, in press.
69. Parfieniuk A, Flisiak R. Role of cannabinoids in chronic liver diseases. World J Gastroenterol 2008; 14: 6109-14.
70. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, *et al*. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 2008; 134: 432-9.
71. Hézode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, *et al*. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. Hepatology 2005; 42: 63-71.
72. Chan PC, Sills RC, Braun AG, *et al*. Toxicity and carcinogenicity of delta 9-tetrahydrocannabinol in Fischer rats and B6C3F1 mice. Fundamental Appl Toxicol 1996; 30: 109-17.
73. Ray AP, Griggs L, Darmani NA. Delta 9-tetrahydrocannabinol suppresses vomiting behavior and Fos expression in both acute and delayed phases of cisplatin-induced emesis in the least shrew. Behav Brain Res 2009; 196: 30-6.
74. Galal AM, Slade D, Gul W, *et al*. Naturally occurring and related synthetic cannabinoids and their potential therapeutic applications. Recent Pat CNS Drug Discov 2009; 4: 112-36.
75. Bambico FR, Duranti A, Tontini A, *et al*. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. Curr Pharm Des 2009; 15: 1623-46.
76. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2006; 102: 89-96.
77. Kopp-Schneider A, Haertel T, Burkholder I, *et al*. Investigating the formation and growth of alpha-particle radiation-induced foci of altered hepatocytes: a model-based approach. Radiat Res 2006; 166: 422-30.
78. Lehnert BE, Goodwin EH, Deshpande A. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. Cancer Res 1997; 57: 2164-71.
79. Greaves P, Goonetilleke R, Nunn G, *et al*. Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. Cancer Res 1993; 53: 3919-24.
80. Vickers AE, Lucier GW. Estrogen receptor, epidermal growth factor receptor and cellular ploidy in elutriated subpopulations of hepatocytes during liver tumor promotion by 17 alpha-ethinylestradiol in rats. Carcinogenesis 1991; 12: 391-9.
81. Creech JL, Johnson MN. Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride. J Occup Med 1974; 16: 150-1.
82. Pirastu R, Baccini M, Biggeri A, *et al*. Epidemiologic study of workers exposed to vinyl chloride in Porto Marghera: mortality update. Epidemiol Prev 2003; 27: 161-72. [Italian].
83. Ward E, Boffetta P, Andersen A, *et al*. Update of follow-up of mortality and cancer incidence among European workers employed in the vinyl chloride industry. Epidemiology 2001; 12: 710-8.
84. Maltoni C. Occupational carcinogenesis. Report to the Second International Symposium on Cancer Detection and Prevention (Bologna, April 9-12, 1973). Adv Tum Prev Detect Charact 1974; 2: 19-26.
85. Maltoni C, Lefemine G, Ciliberti A, *et al*. Experimental research on vinyl chloride carcinogenesis. In Maltoni C, Mehlman MA: Archives of research on industrial carcinogenesis, Vol 2. Princeton: Princeton Scientific Publishers, 1984.
86. Barbin A, Froment O, Boivin S, *et al*. p53 gene mutation pattern in rat liver tumors induced by vinyl chloride. Cancer Res 1997; 57: 1695-8.
87. Chen CJ, Wang CJ. Ecological correlation between arsenic level in well wate and age-adjusted mortality from malignant neoplasm. Cancer Res 1990; 50: 5470-4.
88. Tsai SM, Wang TN, Ko YC. Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. Arch Environ Health 1999; 54: 186-93.
89. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 23. Some Metals and Metallic Compounds. Lyon: IARC, 1980.
90. Bond GG, McLaren EA, Sabel FL, *et al*. Liver and biliary tract cancer among chemical workers. Am J Ind Med 1990; 18: 19-24.
91. Rubel LR, Ishak KG. Thorotrast-associated cholangiocarcinoma: an epidemiologic and clinicopathologic study. Cancer 1982; 50: 1408-15.
92. Hardell L, Bengtsson NO, Jonsson U, *et al*. Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria - an epidemiological investigation. Br J Cancer 1984; 50: 389-97.
93. Wong N, Lai P, Pang E, *et al*. Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. Clin Cancer Res 2000; 6: 4000-9.
94. Wong NA, Rae F, Simpson KJ, *et al*. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. Mol Pathol 2000; 53: 88-93.
95. Kiran M, Chawla YK, Kaur J. Glutathione-S-transferase and microsomal epoxide hydrolase polymorphism and viral-related hepatocellular carcinoma risk in India. DNA Cell Biol 2008; 687-94.
96. Tiemersma EW, Omer RE, Bunschoten A, *et al*. Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 785-91.

97. Kirk GD, Turner PC, Gong Y, *et al*. Hepatocellular carcinoma and polymorphisms in carcinogen-metabolizing and DNA repair enzymes in a population with aflatoxin exposure and hepatitis B virus endemicity. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 373-9.
98. Borentain P, Gérolami V, Ananian P, *et al*. DNA-repair and carcinogen-metabolising enzymes genetic polymorphisms as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in Caucasian liver-transplanted patients. Eur J Cancer 2007; 43: 2479-86.
99. White DL, Li D, Nurgalieva Z, *et al*. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. Am J Epidemiol 2008; 167: 377-89.
100. Huff J, Cirvello J, Haseman J, *et al*. Chemicals associated with site-specific neoplasia in 1394 long-term carcinogenesis experiments in laboratory rodents. Environ Health Perspect 1991; 93: 247-70.
101. Grisham JW. Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implication for cancer risk assessment. Carcinogenesis 1996; 18: 59-81.
102. Huff J. Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazards. Issue controversies, and uncertainties. Ann NY Acad Sci 1999; 895: 56-79.
103. US National Academy of Sciences. Toxicity testing. Strategies to determine needs and priorities. Washington: National Academy Press, 1984.
104. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D. Cancer Prevention: the lesson from the lab. In Biasco G, Tanneberger S. Cancer medicine at the dawn of the 21st century: the view from Bologna. Bologna: Bononia University Press, 2006, 49-64.
105. Huff J. Chemicals studied and evaluated in long-term carcinogenesis bioassays by both the Ramazzini Foundation and the National Toxicology Program: in tribute to Cesare Maltoni and David Rall. Ann NY Acad Sci 2002; 982: 208-30.
106. Soffritti M, Belpoggi F, Minardi F, *et al*. Ramazzini Foundation cancer program: history and major projects, life-span carcinogenicity bioassays design, chemical studies, and results. Ann NY Acad Sci 2002; 982: 26-45.
107. Maronpot RR, Flake G, Huff J. Relevance of animal carcinogenesis findings to human cancer predictions and prevention. Toxicol Pathol 2004; 32(Suppl. 1): 40-48.
108. Frith CH, Ward JM. A morphologic classification of proliferative and neoplastic hepatic lesions in mice. J Environ Pathol Toxicol 1980; 3: 329-51.
109. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, National Academy of Sciences. Histologic typing of liver tumors in the rat. J Natl Cancer Inst 1980; 64: 178-206.
110. Altmann HW. Hepatic neoformations. Pathol Res Pract 1994; 190: 513-77.
111. Goldfarb S, Pugh TD. Multistage rodent hepatocarcinogenesis. Prog Liver Dis 1986; 8: 597-620.
112. Machotka SV. Hepatocellular neoplasia in fish, rats and man: a selected comparative review. In Vivo 1992; 6: 339-48.
113. Guettier C. Which stem cells for adult liver? Ann Pathol 2005; 25: 33-44. [In French].
114. Frith CH, Baetcke KP, Nelson CJ, *et al*. Sequential morphogenesis of liver tumors in mice given benzidine dihydrochloride. Eur J Cancer 1980; 16: 1205-16.
115. Maronpot RR, Haseman J, Boorman G, *et al*. Liver lesions in B6C3F1 mice: the National Toxicology Program experience and position. Arch Toxicol 1987; 10 (Suppl.): 10-26.
116. Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. IARC Sci Publ 1992; 389-427.
117. Bannasch P, Haertel T, Su Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. Toxicol Pathol 2003; 31: 134-9.
118. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, *et al*. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocallular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 8847-51.
119. Saffroy R, Pham P, Reffas M, *et al*. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. Clin Chem Lab Med 2007; 45: 1169-79.
120. Bressac B, Kew M, Wands J, *et al*. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature 1991; 350: 429-31.
121. Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. Semin Liver Dis 1999; 19: 235-42.
122. Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, *et al*. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation. Gastroenterology 1995; 108: 1176-82.
123. Kennedy SM, Macgeogh C, Jaffe R, *et al*. Overexpression of the oncoprotein p53 in primary hepatic tumors of childhood does not correlate with gene mutations. Hum Pathol 1994; 25: 438-42.
124. Devereaux TR, White CM, Sills R, *et al*. Low frequency of H-ras mutations in hepatocellular adenomas and carcinomas and in hepatoblastomas from B6C3F1 mice exposed to oxazepam in the diet. Carcinogenesis 1994; 15: 1083-7.
125. Anna CH, Sills RC, Foley JF, *et al*. Beta-catenin mutations and protein accumulation in all hepatoblastomas examined from B6C3F1 mice trated with antraquinone or oxazepam. Cancer Res 2000; 60: 2864-8.
126. Lin Y, Shi CY, Li B, *et al*. Tumor suppressor p53 and Rb genes in human hepatocellular carcinoma. Ann Acad Med Singapore 1996; 25: 22-30.
127. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. Oncogene 2006; 25: 3778-86.
128. Pogribny IP, James SJ. De novo methylation of the p16INK4A gene in early preneoplastic liver and tumors

induced by folate/methyl deficiency in rats. Cancer Lett 2002; 187: 69-75.
129. Inagaki M, Moustakas A, Lin HY, *et al*. Growth inhibition by transforming growth factor beta (TGF-beta) type I is restored in TGF-beta-resistant hepatoma cells after expression of TGF-beta receptor type II cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5359-63.
130. Sue SR, Chari RS, Kong FM, *et al*. Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. Ann Surg 1995; 222: 171-8.
131. Mills JJ, Falls JG, De Souza AT, *et al*. Imprinted M6p/Igf2 receptor is mutated in rat liver tumors. Oncogene 1998; 16: 2797-802.
132. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, *et al*. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 1997; 275: 1787-90.
133. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, *et al*. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. Hepatology 2006; 43: 515-24.
134. Mao TL, Chu JS, Jeng YM, *et al*. Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. J Pathol 2001; 193: 95-101.
135. Devereux TR, Anna CH, Foley JF, *et al*. Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. Oncogene 1999; 18: 4726-33.
136. National Toxicology Program. Historical controls. http://ntp.niehs.nih.gov 2009 (Accessed August 15, 2009).
137. Yeh CN, Maitra A, Lee KF, *et al*. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. Carcinogenesis 2004; 25: 631-6.
138. Al-Bader A, Mathew TC, Abul H, *et al*. Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. Mol Cell Biochem 2000; 208: 1-10.
139. Jan YY, Yeh TS, Yeh JN, *et al*. Expression of epidermal growth factor receptor, apomucins, matrix metalloproteinases, and p53 in rat and human cholangiocarcinoma: appraisal of an animal model of cholangiocarcinoma. Ann Surg 2004; 240: 89-94.
140. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, *et al*. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the study of the liver. J Hepatol 2001; 35: 421-30.
141. Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, *et al*. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2009; 15: 1301-14.
142. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. Hepatology 1998; 27: 273-8.
143. Sherman M. Alpha-fetoprotein: an obituary. J Hepatol 2001; 34: 603-5.
144. Trevisiani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, *et al*. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HbSAg and anti-HCV. J Hepatol 2001; 34: 570-5.
145. França AV, Elias Junior J, Lima BL, *et al*. Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. Braz J Med Biol Res 2004; 37: 1689-705.
146. Grizzi F, Franceschini B, Hamrick C, *et al*. Usefulness of cancer testing antigens as biomarkers for the diagnosis and the treatment of hepatocellular carcinoma. J Transl Med 2007; 5: 3.
147. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, *et al*. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2003; 125: 89-97.
148. Giannelli G, Fransvea E, Trerotoli P, *et al*. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. Clin Chim Acta 2007; 383: 147-52.
149. Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, *et al*. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2005; 43: 1007-12.
150. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, *et al*. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. Lancet 2001; 357: 1069-75.
151. Gebo KA, Chander G, Jenckes MW, *et al*. Screening tests for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a systematic review. Hepatology 2002; 36: S84-92.
152. Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, *et al*. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. Comp Hepatol 2004; 3: 8.
153. Smith JO, Sterling RK. Systematic review: non-invasive methods of fibrosis analysis in chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol Ther; in press.
154. Dolmazashvili E, Zhamutashvili M, Svanidze M, *et al*. Fibroscan and FibroTest/ FibroMax to assess liver fibrosis/cirrhosis in patients with chronic HBV and HCV infection in Georgia. Georgian Med News 2008; 165: 83-7.
155. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, *et al*. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. Comp Hepatol 2005; 4: 10.
156. Friedrich-Rust M, Müller C, Winckler A, *et al*. Assessment of liver fibrosis and steatosis in PBC with FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and serum markers. J Clin Gastroenterol; in press.
157. Paradis V, Degos F, Dargère D, *et al*. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum

protein profiling of patients with chronic liver diseases. Hepatology 2005; 41: 40-7.
158. Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, *et al*. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. Clin Cancer Res 2008; 14: 470-7.
159. Beretta L. Comparative analysis of the liver and plasma proteomes as a novel and powerful strategy for hepatocellular carcinoma biomarker discovery. Cancer Lett; in press.
160. Huff J, Jacobson MF, Davis DL. The limits of two-year bioassay exposure regimens for identifying chemical carcinogens. Environ Health Perspect 2008; 11: 1439-42.
161. Baker SG. Improving the biomarker pipeline to develop and evaluate cancer screening tests. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 1116-9.
162. Colby LA, Morenko BJ. Clinical considerations in rodent bioimaging. Comp Med 2004; 54: 623-30.
163. Beckmann N, Kneuer R, Gremlich HU, *et al*. In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery. NMR Biomed 2007; 20: 154-85.
164. Klabbers BM, de Munck JC, Slotman BJ, *et al*. Matching PET and CT scans of the head and neck area: development of method and validation. Med Phys 2002; 29: 2230-8.
165. Frezza EE, Gerunda GE, Farinati F, *et al*. CCL4-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats: relationship to plasma zinc, copper and estradiol levels. Hepatogastroenterology 1994; 41: 367-9.
166. Hashimoto M, Kothary PC, Raper SE. Phenobarbital in comparison with carbon tetrachloride and phenobarbital-induced cirrhosis in rat liver regeneration. J Surg Res 1999; 81: 164-9.
167. Frezza EE, Gerunda GE, Farinati F, *et al*. Sex hormones and trace elements in rat CCL4-induced cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Eur J Cancer Prev 1993; 357-9.
168. Ha WS, Kim CK, Song SH, *et al*. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat: development of hepatotumorigenesis. J Vet Sci 2001; 2: 53-8.
169. Qi Y, Chen X, Chan CY, *et al*. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2008; 122: 2682-8.
170. Tsujiuchi T, Sugata E, Masaoka T, *et al*. Expression and DNA methylation patterns of Tslc1 and Dal-1 genes in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine in rats. Cancer Sci 2007; 98: 943-8.
171. Yang S, Lin HZ, Hwang J, *et al*. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? Cancer Res 2001; 61: 5016-23.
172. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, *et al*. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. J Clin Invest 2004; 113: 1774-83.
173. Jordao AA, Zanutto ME, Domenici FA, *et al*. Progression of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances, damage to DNA and histopathological changes in the liver of rats subjected to a methionine-choline-deficient diet. Basic Clin Pharmacol Toxicol; in press.
174. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, *et al*. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. J Lipid Res 2008; 49: 1068-76.
175. Praet MM, Roels HJ. Histogenesis of cholangiomas and cholangiocarcinomas in thioacetamide fed rats. Exp Pathol 1984; 26: 3-14.
176. Yeh CN, Lin KJ, Hsiao IT, *et al*. Animal PET for thioacetamide-induced rat cholangiocarcinoma: a novel and reliable platform. Mol Imaging Biol 2008; 10: 209-16.